

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international**



**(43) Date de la publication internationale  
10 mai 2002 (10.05.2002)**

PCT

**(10) Numéro de publication internationale**  
**WO 02/36787 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12N 15/82

HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
ZW

**(22) Date de dépôt international :** 30 octobre 2001 (30.10.2001)

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclarations en vertu de la règle 4.17 :**

- relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un brevet (règle 4.17.ii)) pour les désignations suivantes AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

WO 02/36787 A2

(54) Title: HERBICIDE-TOLERANT PLANTS THROUGH BYPASSING METABOLIC PATHWAY

**(54) Titre : PLANTES TOLERANTES AUX HERBICIDES PAR CONTOURNEMENT DE VOIE METABOLIQUE**

**(57) Abstract:** The invention concerns a novel method for making herbicide-tolerant plants, in particular to HPPD inhibiting herbicides, the nucleic acid sequences coding for enzymes capable of being used in said method, expression cassettes containing them and transgenic plants comprising at least one of said expression cassettes.

**(57) Abrégé :** La présente invention concerne une nouvelle méthode permettant de rendre les plantes tolérantes aux herbicides, en particulier aux herbicides inhibiteurs d'HPPD, les séquences d'acides nucléiques codant pour des enzymes susceptibles d'être employées dans cette méthode, les cassettes d'expression les contenant et les plantes transgéniques comprenant au moins l'une de ces cassettes d'expression.

**' Plantes tolérantes aux herbicides par contournement de voie métabolique'**

La présente invention concerne une nouvelle méthode permettant de rendre les plantes tolérantes aux herbicides, en particulier aux herbicides inhibiteurs d'HPPD, les 5 séquences d'acide nucléique codant pour des enzymes susceptibles d'être employées dans cette méthode, les cassettes d'expression les contenant et les plantes transgéniques comprenant au moins l'une de ces cassettes d'expression.

Les hydroxy-phényl pyruvate dioxygénases sont des enzymes qui catalysent la réaction de transformation du para-hydroxy-phényl-pyruvate (HPP) en homogentisate. 10 Cette réaction a lieu en présence de fer ( $Fe^{2+}$ ) en présence d'oxygène (Crouch N.P. & al., Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, 1997).

On connaît par ailleurs certaines molécules inhibitrices de cette enzyme, qui viennent se fixer à l'enzyme pour inhiber la transformation de l'HPP en homogentisate. Certaines de ces molécules ont trouvé un emploi comme herbicides, dans la mesure où 15 l'inhibition de la réaction dans les plantes conduit à un blanchiment des feuilles des plantes traitées, et à la mort des dites plantes (Pallett K. E. et al. 1997 Pestic. Sci. 50 83-84). De tels herbicides ayant pour cible l'HPPD décrits dans l'état de la technique sont notamment les isoxazoles (EP 418 175, EP 470 856, EP 487 352, EP 527 036, EP 560 482, EP 682 659, US 5 424 276) en particulier l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, 20 les dicétonitriles (EP 496 630, EP 496 631), en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub> phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-2,3 Cl<sub>2</sub> phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones (EP 625 505, EP 625 508, US 5,506,195), en particulier la sulcotrione ou la mésotrione, ou encore les pyrazolinates.

Des essais pour confirmer que l'HPPD est bien la cible des dicétonitriles (DKN) 25 et pour mettre en évidence que l'HPPD est, au moins à certaines doses, la cible unique des dicétonitriles ont été effectués en laboratoire en faisant germer des graines d'*Arabidopsis* sur trois types de milieux en conditions stériles in-vitro :

- 1 milieu Murashig et Skoog( Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15, 473-479),
- 30 expérience contrôle de la germination
- 2 milieu MS plus DKN à la dose de 1ppm
- 3 milieu MS plus DKN à la même dose + Homogentisate à la concentration de 5 mM.

Il est très net que sur le milieu 1 la germination se fait normalement, chaque

plantule développant deux cotylédons bien verts. Le développement se fait ensuite normalement. Sur le milieu 2, la germination a lieu mais la plantule qui émerge est blanche, les deux cotylédons ne présentant aucune pigmentation. Les plantules meurent ensuite en quelques jours. Sur le milieu 3, la germination se fait normalement, les 5 cotylédons sont bien verts. Les plantules se développent mais très rapidement, la quantité d'homogentisate dans le milieu diminuant, les premiers symptômes de blanchiment apparaissent et la croissance des plantes s'arrêtent, elles finissent par mourir comme dans l'essai effectué sur le milieu n°2.

Ceci permet de confirmer que l'HPPD est bien la cible des DKN in planta et 10 qu'elle semble être la cible unique. Ceci montre aussi que l'homogentisate est transporté du milieu de culture jusqu'au site cellulaire où il est nécessaire pour le bon fonctionnement de la cellule et la survie de la plante.

Pour rendre les plantes tolérantes aux herbicides, on dispose actuellement de trois stratégies, (1) la détoxicification de l'herbicide par une enzyme venant transformer 15 l'herbicide, ou son métabolite actif, en produits de dégradation non toxique, comme par exemple les enzymes de tolérance au bromoxynil ou au basta (EP 242 236, EP 337 899) ; (2) la mutation de l'enzyme cible en une enzyme fonctionnelle moins sensible à l'herbicide, ou son métabolite actif, comme par exemple les enzymes de tolérance au glyphosate (EP 293 356, Padgett S. R. & al., J. Biol. Chem., 266, 33, 1991) ; ou (3) la 20 surexpression de l'enzyme sensible, de manière à produire dans la plante des quantités suffisantes d'enzyme cible au regard des constantes cinétiques de cette enzyme vis à vis de l'herbicide de manière à avoir suffisamment d'enzyme fonctionnelle, malgré la présence de son inhibiteur.

C'est cette troisième stratégie qui a été décrite pour obtenir avec succès des 25 plantes tolérantes aux inhibiteurs d'HPPD (WO 96/38567), étant entendu que pour la première fois une stratégie de simple surexpression de l'enzyme cible sensible (non mutée) était employée avec succès pour conférer aux plantes une tolérance à un niveau agronomique à un herbicide. L'identification d'HPPD mutées dans leur partie C-terminal présentant une tolérance améliorée aux inhibiteurs d'HPPD a permis d'obtenir 30 une amélioration de la tolérance des plantes par la mise en œuvre de la deuxième stratégie (WO 99/24585).

La présente invention consiste en une nouvelle méthode permettant de rendre les plantes tolérantes à un herbicide qui met en œuvre une nouvelle ou quatrième stratégie

de tolérance herbicide, cette nouvelle stratégie comprenant le contournement de la voie métabolique inhibée par ledit herbicide. Ce contournement métabolique peut se résumer comme suit :

- soit un herbicide « H » actif en inhibant l'activité d'une enzyme « E » qui transforme le substrat « S » en produit « P », ledit produit P et ses métabolites étant essentiels à la vie de la plante,
- le contournement métabolique consiste à exprimer dans la plante au moins une nouvelle enzyme « NE » hétérologue insensible à « H » permettant la conversion de « S » en un produit intermédiaire « I », lequel est ensuite transformé en « P » soit pas les voies de biosynthèse naturelles de la plante soit par l'expression d'au moins 10 une autre enzyme hétérologue « AE » également insensible à « H »,
- le contournement métabolique consistant également à exprimer au moins une autre enzyme hétérologue « AE » insensible à « H » permettant la conversion de « I » en « P », « I » étant soit un intermédiaire naturellement produit par la plante soit obtenu par l'expression d'au moins une nouvelle enzyme hétérologue « NE » 15 insensible à « H » permettant la conversion de « S » en « I ».

La présente invention concerne plus particulièrement une nouvelle méthode permettant de rendre les plantes tolérantes aux inhibiteurs d'HPPD, ladite méthode comprenant le contournement métabolique de l'HPPD.

20 Aucune voie de contournement métabolique n'a été décrite à ce jour dans les plantes.

On connaît de la littérature que la conversion de l'HPP en homogentisate peut être obtenue en effectuant d'abord une conversion de l'HPP en acide 4-hydroxyphénylacétique (4-HPA) par un extrait enzymatique présentant une activité 25 HPP oxydase suivie de la conversion du 4-HPA en homogentisate par un extrait enzymatique présentant une activité 4-HPA 1-hydrolase (WO 99/34008). Cette voie de contournement est représentée par la Figure 1.

Une étude bibliographique révèle que les activités enzymatiques nécessaires pour la construction de la voie de contournement de l'HPPD ont été caractérisées sur des 30 extraits bruts bactériens dans les années 1970. Ainsi, les activités HPP oxydase (HPO, E.C. 1.2.3.-) et 4-HPA 1-hydroxylase (HPAH, E.C. 1.14.13.18.) ont été identifiées respectivement chez *Arthrobacter globiformis* (Blakley, 1977) et chez *Pseudomonas acidovorans* (Hareland *et al.*, 1975). Depuis lors, seule la HPAH a été purifiée par

Suemori *et al.* (1996); cependant, ni la séquence protéique ni la séquence nucléique ne sont publiées. Il faut donc identifier les gènes codant ces activités enzymatiques.

Dans la voie de contournement, la conversion de l'HPP en HGA se fait *via* le 4-HPA. Or, le 4-HPA est un composé rarement identifié chez les plantes. Il est présent chez l'*Astilbe chinensis* (Kindl, 1969), dans les *Plantago* sp. (Swiatek, 1977), dans le pissenlit (*Taraxacum officinale*; Dey & Harborne, 1997), chez les *Artemisia* (Swiatek *et al.*, 1998), dans le fruit du *Forsythia suspensa* (Liu *et al.*, 1998) et enfin chez l'algue marine *Ulva lactuca* (Flodin *et al.*, 1999). Il y a peu de données sur son origine. Il semble pouvoir provenir de la tyrosine, du shikimate, de la tyramine. Il n'y a pas davantage d'information sur son devenir et son rôle dans la plante. Kindl (1969) a montré sa dégradation *via* l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique tandis que Flodin *et al.* (1999) ont démontré sa conversion *via* l'acide 4-hydroxymandélique en 2,4,6-tribromophénol qui s'accumule dans l'algue verte *Ulva lactuca*. Gross (1975) suggère que le 4-HPA pourrait être un régulateur de croissance chez certaines plantes supérieures et Abe *et al.* (1974) le considèrent comme un analogue d'auxine chez les algues.

Pour mettre en œuvre la voie de contournement métabolique de l'HPPD il aura fallu au préalable identifier et isoler les gènes et les séquences d'acide nucléique codant pour la ou les enzymes responsables des deux activités ci-dessus.

20 **Définitions selon l'invention**

« Séquence d'acide nucléique » : une séquence nucléotidique ou polynucléotide, pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, notamment double brin. La séquence d'acide nucléique peut être d'origine naturelle, en particulier ADN génomique ou ADNc, ou encore une séquence synthétique ou semi-synthétique, les acides nucléiques la comprenant ayant été choisis soit pour optimiser les codons d'une séquence codante en fonction de l'organisme hôte dans lequel elle sera exprimée, soit pour introduire ou éliminer un ou plusieurs sites de restriction. Les méthodes de préparation des séquences d'acide nucléique synthétiques ou semi-synthétiques sont bien connues de l'homme du métier.

30 « Séquence capable de s'hybridiser de manière sélective » : les séquences d'acide nucléique qui s'hybrident avec une séquence d'acide nucléique de référence à un niveau supérieur au bruit de fond de manière significative. Le bruit de fond peut être lié à l'hybridation d'autres séquences d'ADN présentes, notamment d'autres ADNc

présentes dans une banque d'ADNc. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybridiser de manière sélective et les séquences définies par les séquence ID ci-dessus selon l'invention est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Le niveau d'interaction peut être mesuré par exemple, par marquage de la sonde avec des éléments radioactifs, comme le 32P. L'hybridation sélective est généralement obtenue en employant des conditions de milieu très sévères (par exemple NaCl 0,03 M et citrate de sodium 0,03 M à environ 50°C-60°C). L'hybridation peut bien entendu être effectuée selon les méthodes usuelles de l'état de la technique (notamment Sambrook & al., 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual).

« Homologue d'une séquence d'acide nucléique » : séquence d'acide nucléique présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à une séquence d'acide nucléique de référence. Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation, ou encore en choisissant les oligonucléotides synthétiques employés dans la préparation de ladite séquence par hybridation. Au regard des multiples combinaisons d'acides nucléiques pouvant conduire à l'expression d'un même acide aminé, les différences entre la séquence de référence selon l'invention et l'homologue correspondant peuvent être importantes. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 60 % par rapport à la séquence de référence, de préférence d'au moins 70 %, plus préférentiellement d'au moins 80%, encore plus préférentiellement d'au moins 90 %. Ces modifications sont généralement et de préférence neutres, c'est à dire que pour une séquence codante elles n'affectent pas la séquence primaire de la protéine ou du peptide codé. Elles peuvent toutefois introduire des modifications non silencieuses, ou mutations, qui n'affectent pas la fonction de la séquence d'acide nucléique par rapport à la séquence de référence. Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre les séquences d'acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul & al., 1993, J. Mol. Evol. 36 :290-300 ; Altschul & al., 1990, J. Mol. Biol. 215 :403-10).

30 « Fragments » : fragment d'une séquence d'acide nucléique ou polypeptidique de référence pour laquelle des parties ont été déletées mais qui conservent la fonction de ladite séquence de référence.

« Hétérologue » : séquence d'acide nucléique différente de la séquence d'acide

- nucléique ayant la même fonction dans un organisme naturel. Une séquence hétérologue peut consister en une séquence d'acide nucléique modifiée *in situ* dans son environnement naturel. Il peut également s'agir d'une séquence d'acide nucléique isolée de son organisme naturel puis réintroduite dans ce même organisme. Il peut également 5 s'agir d'une séquence d'acide nucléique hétérologue par rapport à une autre séquence d'acide nucléique, c'est à dire une séquence associée à une autre séquence, cette association ne se trouvant pas dans la nature. C'est le cas notamment des cassettes d'expression constituées de différentes séquences d'acide nucléique ne se trouvant pas généralement associées dans la nature.
- 10 « Homologue d'une séquence protéique » : séquences protéiques dont la séquence primaire est différente de la séquence primaire de la protéine de référence, mais qui remplit la même fonction que cette séquence de référence. Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre polypeptides ou protéines sont également connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple le « package » UWGCG et le 15 programme BESTFITT pour calculer les homologies (Deveraux & al., 1984, Nucleic Acid Res. 12, 387-395).

« Cassette d'expression » : séquence d'acide nucléique comprenant différents éléments fonctionnels nécessaires à l'expression d'une séquence codante dans un organisme hôte. Ces éléments fonctionnels comprennent dans le sens de la transcription 20 une séquence de régulation promotrice, également appelée promoteur, liée de manière fonctionnelle à une séquence codante et une séquence de régulation terminatrice, également appelée terminateur ou stop. La cassette d'expression peut également comprendre entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante des éléments de régulations tels que des activateurs de transcription ou « enhancers » et/ou 25 des introns.

« Organisme hôte » : on entend essentiellement selon l'invention les cellules végétales ou les plantes. Pour les vecteurs de clonages, les organismes hôtes peuvent également être des bactéries, des champignons ou des levures.

« Cellule végétale » : cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus 30 indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

« Plante » : organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédone ou dicotylédone, plus particulièrement des plantes de

culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le riz, le maïs, le blé, l'orge, la canne à sucre, le colza, le soja, la betterave, la pomme de terre, le tabac, le coton, le trèfle, le gazon, ou les plantes ornementales comme les pétunias, ou encore les bananiers, la vigne, les framboises, les fraises, les tomates, les salades, etc.

- 5     « Séquence de régulation promotrice » : Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence de régulation promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits constitutifs d'origine bactérienne, virale ou végétale ou encore des promoteurs dits 10 lumière dépendants comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante ou tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera les promoteurs d'histone tels que décrits dans la demande EP 0 507 698, ou le promoteur d'actine de riz (US 5,641,876). Parmi les promoteurs d'un gène de virus de plante, on citera celui de la 15 mosaïque du choux fleur (CAMV 19S ou 35S), du CsVMV (US ...) ou le promoteur du circovirus (AU 689 311). On peut encore utiliser une séquence de régulation promotrice spécifique de régions ou de tissus particuliers des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines ([22] Datla, R.& al., Biotechnology Ann. Rev. (1997) 3, 269-296), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la 20 phaseoline, de la glutenine, de l'héliantinine (WO 92/17580), de l'albumine (WO 98/45460), de l'oélosine (WO 98/45461), de l'ATS1 ou de l'ATS3 (PCT/US98/06978, déposée le 20 octobre 1998, incorporée ici par référence). On peut également employer un promoteur inductible avantageusement choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, 25 d'inhibiteurs de proteinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB (US 5 670 349, Tableau 3), le promoteur HMG2 (US 5 670 349), le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'amino cyclopropane carboxylate synthase (ACC synthase) de pomme (WO 98/45445).

« Activateurs de transcription ("enhancer") » : on citera par exemple l'activateur de 30 transcription du virus de la mosaïque du tabac (VMT) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (VET) décrit par Carrington & Freed.

« Introns » : séquences d'acide nucléique non traduites. On citera par exemple l'intron 1 du gène d'histone d'*Arabidopsis* tel que décrit dans la demande de brevet

WO 97/04114 pour une expression dans les plantes dicotylédones, le premier intron de l'actine de riz décrit dans la demande de brevet WO 99/34005, ou l'intron adh1 de maïs pour une expression dans les plantes monocotylédones.

« Séquence codante » : séquence d'acide nucléique traduite. Elle comprend une 5 séquence codant pour une protéine ou un peptide d'intérêt, éventuellement fusionnée en 5' ou en 3' avec une séquence codant pour un peptide signal ou d'adressage vers un compartiment cellulaire particulier.

« Peptide signal ou d'adressage » : peptides fusionnés à une protéine ou à un peptide d'intérêt dans leur partie N- ou C-terminale, reconnus par la machinerie 10 cellulaire permettant l'adressage de la protéine ou du peptide d'intérêt vers un compartiment cellulaire particulier. Il s'agit en particulier de peptides de transit chloroplastiques permettant l'adressage de la protéine ou du peptide d'intérêt dans les chloroplastes, ou de peptides signaux vers divers compartiments cellulaires, par exemple la vacuole, les mitochondries, le réticulum endoplastique, l'appareil de golgi, 15 etc. Le rôle de telles séquences protéiques sont notamment décrites dans le numéro 38 de la revue Plant molecular Biology (1998) consacré en grande partie aux transports des protéines dans les différents compartiments de la cellule végétale (Sorting of proteins to vacuoles in plant cells pp 127-144 ; the nuclear pore complex pp145-162 ; protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes pp 91-207 ; 20 multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts pp 209-221 ; mitochondrial protein import in plants pp 311-338).

« Peptide de transit chloroplastique » : le peptide de transit chloroplastique est codé par une séquence d'acide nucléique en 5' de la séquence d'acide nucléique codant pour une protéine ou un peptide d'intérêt, de manière à permettre l'expression d'une protéine 25 de fusion peptide de transit/protéine (peptide) d'intérêt. Le peptide de transit permet d'adresser la protéine ou le peptide d'intérêt dans les plastes, plus particulièrement les chloroplastes, la protéine de fusion étant clivée entre le peptide de transit et la protéine ou le peptide d'intérêt au passage de la membrane des plastes. Le peptide de transit peut être simple, comme un peptide de transit d'EPSPS (US 5,188,642) ou un peptide de 30 transit de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (ssu RuBisCO) d'une plante, éventuellement comprenant quelques acides aminés de la partie N-terminale de la ssu RuBisCO mature (EP 189 707) ou encore un peptide de transit multiple comprenant un premier peptide de transit de plante fusionné à une partie de la

séquence N-terminale d'une protéine mature à localisation plastidiale, fusionnée à un deuxième peptide de transit de plante tel que décrit dans le brevet EP 508 909, et plus particulièrement le peptide de transit optimisé comprenant un peptide de transit de la ssu RuBisCO de tournesol fusionné à 22 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la ssu RuBisCO de maïs fusionnée au peptide de transit de la ssu RuBisCO de maïs tel que décrit avec sa séquence codante dans le brevet EP 508 909.

« Peptide signal » : ces séquences peptidiques sont notamment décrites dans le numéro 38 de la revue Plant molecular Biology (1998) consacré en grande partie aux transports des protéines dans les différents compartiments de la cellule végétale (Sorting of proteins to vacuoles in plant cells pp 127-144 ; the nuclear pore complex pp 145-162 ; protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes pp 91-207 ; multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts pp 209-221 ; mitochondrial protein import in plants pp 311-338). Des peptides d'adressage vers la vacuole sont largement décrits dans la littérature (Neuhaus J.M. and Rogers J.C Sorting of proteins to vacuoles in plant cells Plant molecular Biology 38 : 127-144, 1998). De préférence, le peptide vacuolaire est le peptide vacuolaire de la protéine décrite dans J.M. Ferullo et al (Plant Molecular Biology 33 : 625-633, 1997), fusionné à la partie C-terminale de la protéine ou du peptide d'intérêt.

« Séquence de régulation terminatrice » : comprenant également les séquences de polyadénylation, on entend toute séquence fonctionnelle dans les cellules végétales ou les plantes qu'elles soient d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'origine virale, comme par exemple le terminateur du CaMV 35S, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

« Vecteur » : vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins une cassette d'expression. Le vecteur comprend outre la cassette d'expression, au moins une origine de réplication. Le vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmid, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction de la cassette d'expression. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature. Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de réplication et d'expression.

De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes est un plasmide.

#### HPP Oxydase

Un premier objet de l'invention concerne une séquence d'acide nucléique codant pour une HPP Oxydase, et le polypeptide correspondant. De manière préférentielle, l'HPP oxydase est insensible aux inhibiteurs d'HPPD, en particulier aux isoxazoles comme l'isoxaflutole et leurs dikétonitriles, notamment ceux définis précédemment. L'HPP oxydase est notamment une HPP oxydase d'origine bactérienne, par exemple d'*Arthrobacter*, en particulier d'*Arthrobacter globiformis*. L'HPP oxydase est avantageusement une protéine dont la séquence primaire d'acides aminés est représentée par l'identificateur de séquence n°2 (SEQ ID NO 2) ses séquences homologues et ses fragments.

Des séquences protéiques d'HPP oxydases homologues de la SEQ ID NO 2 sont notamment représentées par les SEQ ID NO 4 et 6, ses séquences homologues et ses fragments.

L'HPP oxydase représentée par la SEQ ID NO 4 correspond à l'HPP oxydase de la SEQ ID NO 2 pour laquelle une Glycine est remplacée par une Alanine.

La présente invention concerne également une séquence d'acide nucléique codant pour une HPP oxydase telle que définie ci-dessus.

De manière préférentielle, la séquence codant pour l'HPP oxydase est une séquence d'ADN, notamment ADN génomique ou ADN-c, en particulier une séquence hétérologue ou isolée.

La séquence codant pour une HPP oxydase selon l'invention est notamment choisie parmi les séquences codantes des séquences d'ADN représentées par les SEQ ID NO 1, 3, 5 ou 15, leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capable de s'hybrider de manière sélective aux SEQ ID 1, 3, 5 ou 15.

La séquence codante de la SEQ ID NO 5 comprend trois mutations en positions 463, 602 et 1511 par rapport à la SEQ ID NO 1 qui sont silencieuses, c'est à dire n'introduisant aucune modification du polypeptide correspondant.

#### 4-HPA 1-hydroxylase

Un deuxième objet de l'invention concerne les moyens nécessaires à l'expression de la 4-HPA 1-hydroxylase. Contrairement à ce qui était attendu de la littérature sur l'activité de certains extraits protéiques, il a été constaté que l'activité 4-HPA 1-

hydroxylase dans les bactéries, en particulier *Pseudomonas*, résultait de la somme de l'activité de deux enzymes dénommées ci-après HPAH et HPAC.

#### HPAH

L'HPAH permet la conversion de l'HPA en métabolite intermédiaire dénommé ci-après métabolite Z dont la structure reste indéterminée. Il peut être envisagé sérieusement que l'HPAH permet l'hydroxylation du noyau aromatique de l'HPA, le métabolite Z se stabilisant sous forme d'une cétone. Cette hypothèse d'activité enzymatique est représentée sur la figure 2.

Un deuxième objet de l'invention concerne donc une séquence d'acide nucléique codant pour une HPAH, et le polypeptide correspondant. De manière préférentielle, l'HPAH est insensible aux inhibiteurs d'HPPD, en particulier aux isoxazoles comme l'isoxaflutole et leurs dikétonitriles, notamment ceux définis précédemment. L'HPAH est notamment une HPAH d'origine bactérienne, par exemple de *Pseudomonas*, en particulier de *Pseudomonas acidovorans*. L'HPAH est avantageusement une protéine dont la séquence primaire d'acides aminés est représentée par les identificateurs de séquence n°8 et 18 (SEQ ID NO 8 et SEQ ID NO 18) leurs séquences homologues et leurs fragments.

La présente invention concerne également une séquence d'acide nucléique codant pour une HPAH telle que définie ci-dessus.

De manière préférentielle, la séquence codant pour l'HPAH est une séquence d'ADN, notamment ADN génomique ou ADN-c, en particulier une séquence hétérologue ou isolée.

La séquence codant pour une HPAH selon l'invention est notamment choisie parmi les parties codantes des séquences représentées par les SEQ ID NO 7 ou 17, leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capable de s'hybrider de manière sélective aux SEQ ID NO 7 ou 17.

#### HPAC

L'HPAC est la deuxième enzyme permettant la conversion du métabolite Z en homogentisate.

Un troisième objet de l'invention concerne donc une séquence d'acide nucléique codant pour une HPAC, et le polypeptide correspondant. De manière préférentielle, l'HPAC est insensible aux inhibiteurs d'HPPD, en particulier aux isoxazoles comme l'isoxaflutole et leurs dikétonitriles, notamment ceux définis précédemment. L'HPAH

est notamment une HPAC d'origine bactérienne, par exemple de *Pseudomonas*, en particulier de *Pseudomonas acidovorans*. L'HPAH est avantageusement une protéine dont la séquence primaire d'acides aminés est représentée par l'identificateur de séquence n°10 (SEQ ID NO 10) ses séquences homologues et ses fragments.

5. Des séquences protéiques d'HPAC homologues de la SEQ ID NO 10 sont notamment représentées par les SEQ ID NO 12, 14 et 20, leurs séquences homologues et leurs fragments.

La présente invention concerne également une séquence d'acide nucléique codant pour une HPAC telle que définie ci-dessus.

10. De manière préférentielle, la séquence codant pour l'HPAC est une séquence d'ADN, notamment ADN génomique ou ADN-c, en particulier une séquence hétérologue ou isolée.

La séquence codant pour une HPAC selon l'invention est notamment choisie parmi les parties codantes des séquences représentées par les SEQ ID NO 9, 11, 13 ou 19, 15 leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux SEQ ID NO 9, 11, 13 ou 19.

#### Cassettes d'expression

La présente invention concerne également une cassette d'expression dont la séquence codante comprend une séquence d'acide nucléique sélectionnée parmi les 20 séquences d'acide nucléique codant pour une HGA oxydase, une HGAH ou HGAC telles que définies ci-dessus.

La séquence codante peut également comprendre en 5' ou en 3' une séquence codant pour un peptide signal ou un peptide de transit. De manière avantageuse, la séquence codante comprend en 5' de la séquence codant pour HGA oxydase, une HGAH ou une 25 HGAC, une séquence codant pour un peptide de transit d'adressage chloroplastique, en particulier un peptide de transit multiple, plus particulièrement le peptide de transit optimisé.

La présente invention concerne donc également une protéine de fusion peptide de transit/HGA oxydase, peptide de transit/HGAH ou peptide de transit/HGAC, la séquence 30 du peptide de transit étant définie précédemment, en particulier la séquence du peptide de transit optimisé tel que décrit dans la demande de brevet EP 508 909.

De manière préférentielle, la séquence de régulation promotrice est choisie parmi les séquence de régulation promotrice permettant une expression constitutive de la

· séquence codante. Il s'agira en particulier des séquences des promoteurs du CaMV 35S, du CsVMV, de l'actine de riz ou d'histone.

On peut également choisir d'exprimer les séquences codantes selon l'invention à un niveau d'expression voisin du niveau d'expression du gène que l'on cherche à contourner. On pourra employer dans la cassette d'expression selon l'invention une séquence de régulation promotrice choisie parmi les séquences de régulation promotrices d'HPPD de plantes.

Pour l'expression des trois enzymes HPP oxydase, HGAH et HGAC dans une même plante, on pourra choisir les cassettes d'expression des séquences codantes correspondantes, des séquences de régulation promotrices différentes présentant des profils d'expression différents, par leur force et/ou leur localisation dans les différents organes fonctionnels de la plante.

On pourra choisir des séquences de régulation promotrice permettant un gradient d'expression HGAC>HGAH>HPP oxydase ou inversement.

15 Pour l'expression de l'HPP oxydase, de l'HGAH et de l'HGAC, la séquence de régulation promotrice est avantageusement choisie parmi le groupe comprenant les promoteurs d'HPPD de plante, d'histone H3 ou H4, notamment *d'Arabidopsis* ou de maïs, en particulier ceux décrits dans la demande de brevet EP 507 698, de SSU de RuBisCO de plante, en particulier de tournesol ou de maïs comme décrit dans la demande de brevet WO 99/25842, du CaMV 35S ou du CsVMV, et leurs combinaisons, en particulier les promoteurs hybrides histone/35S tels que décrits dans les exemples de la demande de brevet EP 507 698. Pour une expression dans les plantes monocotylédones, ces séquences de régulation promotrices seront avantageusement associées avec le premier intron de l'actine de riz.

25 Selon un mode de réalisation de l'invention, la cassette d'expression codant pour une HPP oxydase comprend un promoteur d'histone, une séquence codant pour une HPP oxydase et un terminateur d'histone (Figure 12 ; SEQ ID NO 15).

30 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cassette d'expression codant pour une HPAH comprend un promoteur CaMV 35S, une séquence codant pour une HPAH et un terminateur NOS (Figure 11 ; SEQ ID NO 17).

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cassette d'expression codant pour une HPAC comprend un promoteur CsVMV, une séquence codant pour une HPAC et un terminateur NOS (Figure 10 ; SEQ ID NO 19).

**Vecteurs :**

La présente invention concerne également un vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant au moins une cassette d'expression selon l'invention.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, le vecteur comprend une seule cassette d'expression selon l'invention choisie parmi les cassettes comprenant une séquence codante pour une HPP oxydase, une HGAH ou HGAC telles que définies précédemment.

Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, le vecteur comprend deux cassettes d'expression selon l'invention choisies parmi les cassettes comprenant une séquence codante pour une HPP oxydase, une HGAH ou HGAC telles que définies précédemment associées deux à deux dans un même vecteur : HPP oxydase et HGAH, HPP oxydase et HGAC, HGAH et HGAC.

Un vecteur comprenant une cassette d'expression codant pour l'HPAH et une autre codant pour l'HPAC peut comprendre la combinaison des deux cassettes d'expression définies précédemment (SEQ ID NO 17 et 19). Une telle cassette d'expression est représentée par la Figure 13 et la SEQ ID NO 21.

Selon un troisième mode de réalisation de l'invention, le vecteur comprend trois cassettes d'expression selon l'invention, une première cassette d'expression de l'HPP oxydase, une deuxième cassette d'expression de l'HGAH et une troisième cassette d'expression de l'HGAC. Une telle cassette d'expression peut comprendre la combinaison des trois cassettes définies précédemment (SEQ ID NO 15, 17 et 19). Un tel vecteur est représentée sur la figure 14 et la SEQ ID NO 22.

Les vecteurs selon l'invention tels que définis ci-dessus peuvent également comprendre des cassettes d'expression d'autres protéines ou peptides d'intérêt.

Lorsque le vecteur comprend plusieurs cassettes d'expression, ces dernières peuvent prendre différentes orientations deux à deux l'une par rapport à l'autre, colinéaires, divergentes ou convergentes.

Les cassettes d'expression d'autres protéines ou peptides d'intérêt comprennent une séquence d'acide nucléique codant pour des protéines ou peptides d'intérêt différents de l'HPP oxydase, de l'HGAH et de l'HGAC définis ci-dessus.

Il peut s'agir de séquences d'un gène codant pour un marqueur de sélection comme d'un gène conférant à la plante transformée de nouvelles propriétés agronomiques, ou d'un gène d'amélioration de la qualité agronomique de la plante transformée.

### Marqueurs de Sélection

Parmi les gènes codant pour des marqueurs de sélection, on peut citer les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes de tolérance aux herbicides (bialaphos, glyphosate ou isoxazoles), des gènes codant pour des enzymes rapporteurs facilement identifiables comme l'enzyme GUS, des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

### 10 Gènes d'intérêt

Parmi les gènes conférant de nouvelles propriétés agronomiques aux plantes transformées, on peut citer les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, ceux conférant une résistance à certains insectes, ceux conférant une tolérance à certaines maladies, etc. De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 15 91/02071 et WO 95/06128.

### Tolérance herbicide

La présente invention est particulièrement appropriée pour l'expression de gènes conférant une tolérance à certains herbicides aux cellules végétales et aux plantes monocotylédones transformées. Parmi les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, on peut citer le gène Bar conférant une tolérance au bialaphos, le gène codant pour une EPSPS appropriée conférant une résistance aux herbicides ayant l'EPSPS comme cible comme le glyphosate et ses sels (US 4,535,060, US 4,769,061, US 5,094,945, US 4,940,835, US 5,188,642, US 4,971,908, US 5,145,783, US 5,310,667, US 5,312,910, US 5,627,061, US 5,633,435, FR 2 736 926), le gène codant pour la glyphosate oxydoréductase (US 5,463,175), ou encore un gène codant pour une HPPD conférant une tolérance aux herbicides ayant pour cible l'HPPD comme les isoxazoles, notamment l'isoxafutole (FR 95 06800, FR 95 13570), les dicétonitriles (EP 496 630, EP 496 631) ou les tricéttones, notamment la sulcotrione (EP 625 505, EP 625 508, US 5,506,195). De tels gènes codant pour une HPPD conférant une tolérance aux herbicides ayant pour cible l'HPPD sont décrits dans la demande de brevet WO 96/38567.

Parmi les gènes codant pour une EPSPS appropriée conférant une résistance aux herbicides ayant l'EPSPS comme cible, on citera plus particulièrement le gène codant

pour une EPSPS végétale, en particulier de maïs, présentant deux mutations 102 et 106, décrit dans la demande de brevet FR 2 736 926, dénommé ci-dessous EPSPS double mutant, ou encore le gène codant pour une EPSPS isolée d'*Agrobacterium* décrit par les séquences ID 2 et ID 3 du brevet US 5,633,435, dénommé ci-dessous CP4.

5 Parmi les gènes codant pour une HPPD conférant une tolérance aux herbicides ayant pour cible l'HPPD, on citera plus particulièrement l'HPPD de *Pseudomonas* et celle d'*Arabidopsis*, décrites dans la demande de brevet WO 96/38567.

10 Dans les cas des gènes codant pour EPSPS ou HPPD, et plus particulièrement pour les gènes ci-dessus, la séquence codant pour ces enzymes est avantageusement précédée par une séquence codant pour un peptide de transit, en particulier pour le peptide de transit dit peptide de transit optimisé décrit dans les brevets US 5,510,471 ou US 5,633,448.

#### Résistance aux Insectes

15 Parmi les protéines d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux insectes, on citera plus particulièrement les protéines *Bt* largement décrites dans la littérature et bien connues de l'homme du métier. On citera aussi les protéines extraites de bactéries comme *Photorabdus* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

#### Résistance aux Maladies

20 Parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux maladies on citera notamment les chitinases, les glucanases, l'oxalate oxydase, toutes ces protéines et leurs séquences codantes étant largement décrites dans la littérature, ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines 25 comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

30 Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines (Kamoun & al., 1993 ; Panabières & al., 1995).

#### Modification de la qualité

On peut également citer les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en

particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les graines desdites plantes. On citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés (Korit, A.A. & al., Eur. J. Biochem. (1991) 195, 329-5, 334 ; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ; WO 94/20828 ; WO 92/14822). Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire, permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité liés à une surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des gènes codant pour des peptides riches en 10 acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou antifongique. On citera plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute origine, et plus particulièrement les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine 15 (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

#### Cellules végétales et plantes transgéniques

La présente invention concerne également des cellules végétales et des plantes transformées comprenant au moins une cassette d'expression d'une HPP oxydase, d'une HGAH ou d'une HGAC telles que définies ci-dessus.

20 Selon un premier mode de réalisation de l'invention, les cellules végétales ou les plantes comprennent une seule des cassettes d'expression selon l'invention choisie parmi les cassettes comprenant une séquence codante pour une HPP oxydase, une HGAH ou HGAC telles que définies précédemment.

25 Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, les cellules végétales ou les plantes comprennent deux cassettes d'expression selon l'invention choisies parmi les cassettes comprenant une séquence codante pour une HPP oxydase, une HGAH ou HGAC telles que définies précédemment associées deux à deux dans un même vecteur : HPP oxydase et HGAH, HPP oxydase et HGAC, HGAH et HGAC.

30 Selon un troisième mode de réalisation de l'invention, les cellules végétales ou les plantes comprennent trois cassettes d'expression selon l'invention, une première cassette d'expression de l'HPP oxydase, une deuxième cassette d'expression de l'HGAH et une troisième cassette d'expression de l'HGAC.

Les cellules végétales ou les plantes selon l'invention telles que définis ci-dessus

peuvent également comprendre des cassettes d'expression d'autres protéines ou peptides d'intérêt définies précédemment.

De manière préférentielle, les cassettes d'expression sont intégrées de manière stable dans le génome des cellules végétales ou des plantes. Plus préférentiellement, les 5 plantes selon l'invention sont fertiles, les cassettes d'expression selon l'invention étant transférées à leur descendance.

La présente invention concerne également des graines de plantes transgéniques ci-dessus, lesquelles graines comprennent une cassette d'expression selon l'invention codant pour une HPP oxydase, une HGAH ou une HGAC.

10 Les différentes cassettes d'expression dans les plantes transformées selon l'invention peuvent provenir soit de la même plante transformée parente, et dans ce cas la plante est issue d'un seul procédé de transformation/régénération avec les différentes cassettes d'expression contenues dans un même vecteur ou par co-transformation au moyen de plusieurs vecteurs. Elle peut également être obtenue par le croisement de 15 plantes parentes contenant chacune au moins une cassette d'expression selon l'invention.

#### Transformation des cellules végétales et des plantes

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des cellules végétales et des plantes par introduction d'au moins une séquence d'acide nucléique ou 20 une cassette d'expression selon l'invention telles que définies précédemment, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des 25 tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*. D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de 30 PEG. L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

Lorsque l'on souhaite introduire plusieurs séquences d'acide nucléique ou cassettes d'expression, on peut le faire au moyen d'un seul vecteur selon l'invention comprenant

les différentes cassettes d'expression. Elles peuvent également être introduites dans l'organisme hôte par co-transformation au moyen de plusieurs vecteurs, chacun comprenant au moins une cassette d'expression.

D'une manière générale, les plantes transgéniques selon l'invention sont obtenues 5 par transformation de cellules végétales puis régénération d'une plante, de préférence fertile à partir de la cellule transformée. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus. Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet 10 suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 15 91/02071 et WO 95/06128.

#### Désherbage sélectif

L'invention a aussi pour objet un procédé de désherbage sélectif de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un inhibiteur de l'HPPD notamment un herbicide définit auparavant, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes 20 transformées selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

La présente invention concerne également un procédé de contrôle des mauvaises herbes dans une surface d'un champ comprenant des graines ou des plantes transformées selon l'invention, lequel procédé comprend l'application dans la dite 25 surface du champ d'une dose毒ique pour les dites mauvaises herbes d'un herbicide inhibiteur d'HPPD, sans toutefois affecter de manière substantielle les graines ou plantes transformée selon l'invention.

La présente invention concerne également un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention lequel procédé comprend le semis des graines des dites 30 plantes transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, l'application sur la dite surface du dit champ une dose毒ique pour les mauvaises herbes d'un herbicide ayant pour cible l'HPPD défini ci-dessus en cas de présence de mauvaises herbes, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou

les dites plantes transformées, puis la récolte des plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement la séparation des graines des plantes récoltées.

Par « sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées », on entend selon l'invention que les plantes transformées selon l'invention soumises à une application d'une dose d'herbicide毒ique pour les mauvaises herbes, présentent une phytotoxicité légère ou nulle. Par dose toxique pour les mauvaises herbes, on entend selon l'invention une dose d'application de l'herbicide pour laquelle les mauvaises herbes sont tuées. Par phytotoxicité légère on entend selon l'invention un pourcentage de feuilles blanchies inférieur à 25%, préférentiellement inférieur à 10%, plus préférentiellement inférieur à 5%. Il est entendu également selon la présente invention que l'application de la même dose toxique sur une plante autrement comparable non transformée, c'est à dire ne comprenant pas au moins une cassette d'expression selon l'invention, conduirait à observer sur ladite plante des symptômes de phytotoxicité supérieurs à ceux observés pour la plante transformée selon l'invention.

Dans les deux procédés ci-dessus, l'application de l'herbicide ayant pour cible l'HPPD peut être faite selon l'invention, tant en présémis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

Par herbicide au sens de la présente invention on entend une matière active herbicide seule ou associée à un additif qui modifie son efficacité comme par exemple un agent augmentant l'activité (synergiste) ou limitant l'activité (en anglais safener). Les herbicides inhibiteurs d'HPPD sont en particulier définis auparavant. Bien entendu, pour leur application pratique, les herbicides ci-dessus sont associée de manière en soi connue aux adjutants de formulations utilisés habituellement en agrochimie

Lorsque la plante transformée selon l'invention comprend un autre gène de tolérance à un autre herbicide (comme par exemple un gène codant pour une EPSPS mutée ou non conférant à la plante une tolérance au glyphosate), ou lorsque la plante transformée est naturellement insensible à un autre herbicides, le procédé selon l'invention peut comprendre l'application simultanée ou décalée dans le temps d'un inhibiteur d'HPPD en association avec ledit herbicide, par exemple le glyphosate.

Les différents aspects de l'invention seront mieux compris à l'aide des exemples expérimentaux ci-dessous.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont

données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans Coligan *et al.* (1995), Ausubel *et al.* (1995) ; Mariatis *et al.* (1982), Sambrook *et al.*

Les références bibliographiques citées précédemment sont intégrées par référence à la présente demande de brevet, en particulier les références bibliographiques définissant les séquences d'acide nucléique codant pour des HPPD natives, chimères ou mutées, éventuellement combinées avec un peptide signal ou peptide de transit.

#### **Exemple I: IDENTIFICATION DU GENE CODANT L'HPP OXYDASE D'ARTHROBACTER GLOBIFORMIS**

L'HPP oxydase (HPPO) convertit l'HPP en 4-HPA par une réaction de décarboxylation. Cette enzyme catalyse donc la première activité enzymatique nécessaire pour la construction de la voie métabolique contournant l'HPPD. L'activité HPP oxydase a été caractérisée dans des extraits bruts de *Rhodococcus erythropolis* S1 (Suemori *et al.*, 1995) ou dans un extrait partiellement purifiée d'*Arthrobacter globiformis* (Blakley, 1977). A notre connaissance, la protéine n'a pas été purifiée. Afin de pouvoir introduire cette activité enzymatique dans la plante, il est nécessaire d'en identifier le gène. Différentes approches sont envisageables: (1) la mutagenèse insertionnelle et donc l'identification du gène par la perte de l'activité enzymatique, (2) la complémentation fonctionnelle d'un microorganisme en utilisant une banque génomique, (3) la purification de la protéine pour remonter à la séquence nucléique. Les trois approches furent utilisées. La complémentation fonctionnelle et la mutagenèse insertionnelle seront peu développées, ces techniques n'ayant pas permis d'identifier le gène HPPO.

#### **I.1 Matériels et Méthodes**

##### **I.1.1- Les conditions de culture**

###### **30 I.1.1.1- Les milieux riches**

Le milieu Luria-Bertani (LB; commercialisé par Bio101) est utilisé pour cultiver les bactéries (*E. coli*, *P. fluorescens*) lors des expériences de biologie moléculaire. Pour la culture d'*A. globiformis* on préférera le milieu Columbia-ANC enrichi avec 5% de

sang de mouton (BioMérieux). Ce milieu riche contient deux antibiotiques (acide nalidixique et colimycine) inhibiteurs des germes à Gram négatif. Bien que les trois bactéries poussent sur milieu riche à 37°C, on cultive en général *A. globiformis* et *P. fluorescens* à 29°C.

5           **I.1.1.2- Le milieu de culture M<sup>Ag</sup>**

Le milieu de culture décrit par Blakley (1977) précipite, il faut donc le filtrer avant utilisation. Nous avons changé progressivement le milieu afin d'atteindre un milieu "minimal" optimal. Les facteurs considérés sont la vitesse de croissance d'*A. globiformis* et l'activité enzymatique de l'HPPO. Le milieu retenu (M<sup>Ag</sup>) est un milieu 10 M9 (Maniatis *et al.*, 1982) légèrement modifié: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O (6 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3 g/L); NH<sub>4</sub>Cl (1 g/L); NaCl (0.5 g/L); CaCl<sub>2</sub> (6 mg/L); FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O (6 mg/L); extrait de levure (20 mg/L); et enfin le substrat (HPP ou tyrosine ou citrate) à la concentration 1g/L. Le milieu est autoclavé. Avant utilisation, 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M stérile est ajouté par litre de milieu.

15           Ce milieu minimum est aussi utilisé pour cultiver *P. fluorescens*.

**I.1.2- Construction d'une banque génomique d'*Arthrobacter globiformis***

Il n'existe pas de technique fiable permettant de faire une banque de cDNA bactériens complets. Nous avons donc décidé de créer une banque génomique d'*Arthrobacter globiformis*. Pour la réaliser, nous choisissons le système cosmidique. 20 La banque cosmidique fut réalisée pour les expériences de complémentation fonctionnelle, puis fut utilisée plus tard pour rechercher le ou les cosmides contenant le gène *hppO*.

**I.1.2.1- Le vecteur cosmidique pLAFR5**

**I.1.2.1.1- Description du vecteur**

25           Nous choisissons le vecteur cosmidique conjugal pLAFR-5 (Keen *et al.*, 1988) qui peut recevoir un insert d'environ 20 kb. Pourvu d'une origine de transfert et d'une origine de réplication à large spectre d'hôte à Gram négatif, il peut être transmis à d'autres genres bactériens par conjugaison tri-parentale ce qui peut être utile pour tester la complémentation fonctionnelle chez différents genres bactériens. Il confère une 30 résistance à la tétracycline.

**I.1.2.1.2- Préparation du vecteur**

Le plasmide pLAFR-5 est purifié par un protocole de lyse alcaline (Maniatis *et al.*, 1982), traité à la RNase puis digéré par *Bam* HI et *Sca* I. La digestion par *Bam* HI

permet d'ouvrir le site dans lequel seront "ligués" les inserts d'ADN génomique digérés par *Sau3A*. La digestion par *Sca I* permet de libérer les sites *cos* qui permettent l'encapsidation. Après extraction phénolique puis chloroformique, l'ADN est précipité à l'éthanol. L'ADN sec est solubilisé dans l'eau. Le vecteur ainsi préparé est conservé à - 5 20°C.

#### I.1.2.1- Préparation de l'ADN génomique d'*A. globiformis*

Une culture de 24 heures (200 mL, 180 rpm, 29°C) réalisée dans le milieu (200 mL) décrit par Blakley (1977) est centrifugée à 3000 g à 4°C pendant 15 minutes. Le culot cellulaire, repris par 10 mL de solution de lyse (TE pH 8 ; 0,5 % SDS; 1 mg protéinase K), est incubé à 37°C au bain-marie avec une agitation douce toutes les 20 minutes. Au bout de 90 minutes, la suspension de cellules lysées est versée dans un tube JA-20 en polypropylène. On ajoute alors 10 mL de phénol/ chloroforme/ isoamylalcool (25/24/1) puis on centrifuge à 6 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est alors transféré dans un nouveau tube JA20 auquel on ajoute 1,8 mL d'acétate 10 d'ammonium 10 M et 10 mL d'isopropanol. Après centrifugation à 20 000 g pendant 20 minutes à 4°C, le culot est rincé à l'éthanol 70 %. Le culot sec est repris avec 1 mL TE pH 8 puis transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL auquel 10 µL de RNase (10 mg.mL<sup>-1</sup>) sont additionnés. Après 30 min à 37°C, 800 µL de phénol/ chloroforme/ isoamylalcool sont rajoutés. Après centrifugation, le surnageant est transféré dans un 15 nouveau tube Eppendorf et extrait avec 0,8 mL de chloroforme. Le surnageant est alors transféré dans un dernier tube Eppendorf auquel 200 µL d'acétate d'ammonium 10 M et 800 µL d'isopropanol sont ajoutés. Après centrifugation, le culot est rincé à l'éthanol 70% puis, une fois sec, repris dans 500 µL d'eau. L'ADN génomique est alors stocké à - 20°C.

#### I.1.2.3- Digestion ménagée de l'ADN génomique d'*A. globiformis*

Seuls les cosmides faisant 40-45 kb peuvent être encapsidés. Le vecteur faisant 21,5 kb, les inserts d'ADN génomique d'*A. globiformis* doivent avoir une taille comprise entre 19 et 22 kb. Ces fragments sont obtenus en réalisant une digestion ménagée de l'ADN génomique d'*Arthrobacter globiformis*. Pour définir les conditions optimales de la digestion ménagée nous réalisons des digestions de l'ADN génomique d'*A. globiformis* avec des quantités variables d'enzyme de restriction *Sau 3A*. Il apparaît que la meilleure condition de digestion utilise 0,08 unité enzymatique *Sau 3A* pendant 30 minutes à 37°C. L'ADN génomique ainsi digéré présente une taille comprise entre

15 et 22 kb. L'ADN génomique ainsi digéré est extrait au phénol puis au chloroforme et enfin précipité à l'éthanol.

I.1.2.4- Ligation de l'ADN génomique d'*A. globiformis* dans le vecteur cosmidique

5 La réaction de ligation se fait dans un volume final de 10 µL, contenant 500 ng de pLAFR-5 digéré par *Bam* HI et *Sca* I, 650 ng d'ADN génomique digéré par *Sau* 3A, 320 unités de T<sub>4</sub> DNA ligase (N.E.B.) et 5 mM d'ATP. La ligation se déroule à 12°C pendant la nuit (environ 16 heures). Les 5 mM d'ATP permettent d'éviter les ligations entre les extrémités franches (*Sca* I) (Feretti & Sgaramella, 1981) de telle sorte que les 10 dimères de vecteurs n'ayant pas d'insert ne puissent pas s'encapsider dans la tête des phages λ.

I.1.2.5- Encapsidation des cosmides et amplification de la banque cosmidique

L'encapsidation des cosmides, réalisée en utilisant le kit GIGAPACK II XL 15 (Stratagène) en respectant les instructions du fournisseur, assure une efficacité de transfection supérieure à celles obtenues avec les techniques classiques de transformation. Pour amplifier la banque cosmidique, Keen *et al.* (1988) conseillent d'utiliser les *Escherichia coli* DH-1 et HB101. En effet, lorsque ces souches sont cultivées sur maltose, elles produisent une protéine membranaire qui permet une 20 meilleure fixation du phage et donc une transfection plus efficace des cosmides. La banque, amplifiée en suivant les recommandations de Stratagène, est conservée à -80°C. Pour évaluer la banque cosmidique, l'ADN plasmidique isolé d'une trentaine de clone est digéré par *Apa* I ou *Eco* RI. Les profils de restriction sont observés sur gel d'agarose à 0,8%.

25 I.1.3- Purification de l'HPP oxydase

I.1.3.1- Test colorimétrique de l'activité HPP oxydase

Afin de pouvoir contrôler les étapes de purification, l'activité HPP oxydase est suivie en utilisant le test colorimétrique décrit par Blakley (1977). La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH), en 30 solution dans l'HCl 2 M. La 2,4-DNPH réagit avec la fonction cétone en alpha d'une fonction carboxylique (ex : l'HPP). Il se forme ainsi une hydrazone que l'on peut révéler en alcalinisant le milieu. Lorsque l'HPP est convertit en totalité en 4-HPA pendant la réaction enzymatique, l'hydrazone ne peut pas se former, on obtient donc, en milieu

basique, la couleur jaune caractéristique de la 2,4-DHPA. Si l'HPP n'est pas entièrement convertit en 4-HPA lors de la réaction enzymatique, la formation d'hydrazone est possible. Ces hydrazones prennent une couleur brune en milieu basique. Une variation de coloration entre ces deux extrêmes est obtenue en fonction de la quantité d'HPP consommé. Les mesures d'absorption sont faites à 445 ou 450 nm. Afin de rendre ce test plus facilement manipulable, nous l'avons adapté au format microplaqué à 96 puits. Le mélange réactionnel comprend GSH (900 µM); HPP (135 µM); TPP (1,8 mM); MgCl<sub>2</sub> (4,5 mM); FAD (4 µM); tampon phosphate de potassium (90 mM) pH 7,4. Le mélange est conservé sur glace. Dans chaque puits on dépose 50 µL de la fraction à tester et 150 µL de mélange réactionnel. Après 20 min à 30°C, la réaction enzymatique est stoppée avec 13 µL de solution 2,4-DNPH (0,1% dans HCl 2 M). Laisser réagir 20 min à température ambiante. On révèle la formation d'hydrazone en ajoutant 13 µL de solution NaOH 10 M. Pour réaliser la gamme étalon, des mélanges réactionnels avec des concentrations variables d'HPP sont préparés. Les 50 µL de fraction protéique sont remplacés par 50 µL de tampon d'extraction de la protéine. La courbe étalon est réalisée pour chaque nouvelle solution de 2,4-DNPH (la solution de 2,4-DNPH est stable 6 mois à l'obscurité). L'avantage de ce test est sa rapidité, sa simplicité, mais il a le défaut de mesurer une disparition de substrat et non pas une apparition de produit. En outre, la possibilité d'avoir des faux positifs existe : une activité tyrosine amino-transférase donnera le même résultat que l'activité de l'HPPO. En effet, dans les deux cas, la fonction cétone a disparu. Nous avons donc développé une méthode HPLC rapide et sensible qui permette de confirmer la production de 4-HPA.

#### I.1.3.2- Test d'activité analysé par HPLC

Une méthode HPLC a été mise au point en utilisant une petite colonne Sphérisorb ODS2 50 x 4,6 mm et de granulométrie 3 µm. La chromatographie est réalisée en isocratique A: 90%; B: 10% (où tampon A: H<sub>2</sub>O 0,1% TFA et tampon B: acetonitrile), débit 0,8 mL·min<sup>-1</sup> et l'élution est suivie à 230 nm. Dans ces conditions, il est possible de séparer le 4-HPA, l'HGA, le 3,4-DHPA et l'HPP en 5 minutes après l'injection. La colonne a été réalisée à façon par Merck.

#### I.1.3.3- Purification de la protéine

Lors de la mise au point de ce protocole, un souci de simplicité a été recherché.

##### I.1.3.3.1- Tests préliminaires

Les tests préliminaires ont pour but de déterminer l'influence de composés

(NaCl, KCl, propanol-1, éthylène glycol, etc ...) et du pH sur l'activité enzymatique. Les réactions sont réalisées avec des extraits bruts d'*A. globiformis* cultivé sur milieu M<sup>Ag</sup> contenant de la tyrosine comme seule source de carbone (M<sup>Ag</sup>-tyrosine). Le composé à tester est ajouté dans le milieu réactionnel. Pour mesurer l'influence du pH sur l'activité enzymatique de l'HPPO, différents tampons phosphate sont réalisés.

#### I.1.3.3.2- Protocole de purification

La souche d'*Arthrobacter globiformis* est étalée sur milieu gélosé LB ou sur milieu gélosé Columbia-ANC. Après 16 heures de culture à 29°C, une colonie est prélevée et ensemencée dans 5 mL de milieu LB, en croissance pendant 8 heures à 10 29°C, 180 rpm. 50 µL de cette préculture sont alors inoculés dans 1,5 L de milieu M<sup>Ag</sup>-Tyrosine ou M<sup>Ag</sup>-HPP, la culture est alors réalisée à 29°C, 180 rpm, dans des Erlenmeyer à ailettes (Belco). Après 48 heures de culture, les cellules sont collectées par centrifugation à 5 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les cellules sont remises en suspension dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4 puis centrifugées comme 15 précédemment. Le culot est repris dans 2 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Les cellules sont soniquées (Vibra Cell, Sonic Materials INC., Connecticut, USA) pendant 15 minutes, puissance 4, pulse de 30%, dans la glace fondante. Les débris insolubles sont éliminés par une centrifugation de 25 min à 20 000 g, 4°C. Le surnageant est récupéré, il constitue "l'extrait brut". Il peut être congelé dans l'azote liquide puis 20 conservé à -80°C (pendant 6 mois sans perte apparente d'activité). L'extrait brut est chargé, sans dessalage préalable, sur une colonne échangeuse faible d'anions 'EMD/DEAE 650 S' (Merck) équilibrée en tampon phosphate 50 mM pH 7,4. L'élution de l'activité enzymatique est obtenue en appliquant un gradient de concentration de NaCl (en solution dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les fractions contenant 25 l'activité enzymatique sont rassemblées. La solution protéique obtenue est diluée d'un facteur 2,7 avec du tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les protéines sont alors chargées sur une colonne (XK16, Pharmacia) échangeuse forte d'anions 'source Q' (30 mL, Pharmacia) préalablement équilibrée avec un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les fractions protéiques intéressantes, identifiées par l'activité enzymatique, sont 30 rassemblées puis concentrées sur membrane UVIKON 10 kDa. L'extrait protéique résultant est alors dessalé par la technique de gel-filtration en utilisant une colonne 'PD10' (Pharmacia) équilibrée en tampon phosphate 10 mM pH 7,4 et élué avec ce même tampon. Les protéines sont alors déposées sur une colonne (XK9/15, Pharmacia)

d'hydroxyapatite (2 mL; Hydroxyapatite DNA grade Bio-Gel®HTP gel; Bio-Rad) équilibrée avec 10 mM tampon phosphate pH 7,4. On élue l'activité enzymatique en appliquant un gradient phosphate. Les fractions contenant l'activité enzymatique sont rassemblées et concentrées. On conserve les protéines actives lorsque la concentration protéique est supérieure à 1 mg/mL en ajoutant du FAD, GSH et glycérol afin d'obtenir les concentrations finales suivantes : 27 µM FAD, 110 µM GSH, 0,8% glycérol. Les protéines ainsi préparées peuvent être congelées à -80°C pendant au moins 6 mois.

#### I.1.3.3.3- Dosage des protéines

Le dosage des protéines se fait selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant 10 la  $\gamma$ -globuline pour standard.

#### I.1.3.3.4- Coloration des gels de protéines

Les fractions protéiques sont analysées sur gel de polyacrylamide à 10 % selon la méthode de Laemmli (1970). Après migration, les protéines du gel sont colorées soit en utilisant la méthode au Bleu de Coomassie (Chua, 1980) soit en utilisant la méthode au nitrate d'argent (Schoenle *et al.*, 1984).

#### I.1.4- Microséquençage protéique de l'extrémité N-terminale et de peptides internes

Le microséquençage de la protéine est réalisé en utilisant la méthode d'Edman (Laursen, 1971). Pour obtenir les meilleurs résultats lors du séquençage, le gel est 20 préparé le jour même.

##### I.1.4.1- Préparation du gel d'acrylamide et son électrophorèse

Les gels (8,5%, 10% ou 12%) sont réalisés selon la méthode de Laemmli (1970) en utilisant le système de minigels d'Hoefer®. Les protéines sont diluées au tiers avec une solution 'bleu de dépôt dénaturant' (Tris-HCl 150 mM pH 6,8; SDS 4 %;  $\beta$ -mercaptoéthanol 2% (v/v); glycérol 3,3% (v/v); bleu de Bromophénol 0,03% qsp 10 mL d'eau milliQ). Après avoir été bouillies 5 minutes, les protéines sont chargées sur le gel d'acrylamide. La migration est réalisée à température ambiante en utilisant un tampon de migration dénaturant (Tris base 25 mM; glycine 250 mM;  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,014% (v/v); SDS 0,1 %) et en appliquant une intensité de 15 mA par gel.

##### I.1.4.2- Préparatifs pour le séquençage de l'extrémité N-terminale

Afin de pouvoir réaliser le séquençage de l'extrémité N-terminale, le gel est transféré sur membrane PVDF (PROBLOTT® - Applied Biosystems) en utilisant la technique de transfert semi-sec. L'électrotransfert des polypeptides se fait en 30 minutes

à 300 mA avec l'appareil 'Semy Dry Electroblotter' (Bio-Rad) et dans un milieu à base de CAPS (tampon de transfert: CAPS 10 mM pH 11,0; méthanol 10% (v/v)). Le tampon de transfert ne contient pas de glycine qui risquerait de "polluer" le séquençage. Après le transfert, la membrane est rincée quelques secondes à l'eau milliQ. Elle est alors 5 immergée quelques secondes dans une solution de coloration à base d'amido-schwarz (Aldrich; ref: 19,524-3). La solution est constituée de méthanol 45% (v/v), d'acide acétique 1% (v/v), d'amido-schwarz 0,1% (m/v) et d'eau 63,9% (v/v). Lorsque la bande correspondante à la protéine d'intérêt est visible, la membrane est rincée abondamment à l'eau milliQ puis elle est séchée à l'air. La partie de la membrane contenant la protéine 10 d'intérêt (60 kDa) est découpée et envoyée pour le séquençage.

#### I.1.4.3- Préparatifs en vu du séquençage des peptides internes

Pour visualiser les protéines dans le gel, on utilise un protocole de coloration à l'Amido-Schwarz légèrement différent de celui utilisé pour colorer la membrane PVDF. Après migration, le gel est fixé deux fois trente minutes avec une solution constituée de 15 méthanol 50 %, d'acide acétique 10 %, d'eau milliQ 40 %. La coloration est réalisée avec une solution constituée de méthanol 45 %, d'acide acétique 10 %, d'eau 45 %, d'Amido-Schwarz 0,003 % (p/v). Les protéines apparaissent progressivement. Lorsque la coloration est suffisante pour repérer la protéine, le gel est rincé abondamment à l'eau milliQ. La bande d'intérêt est découpée puis déshydratée au speed-vac (Savant). La 20 bande de gel, ayant perdue environ un tiers de sa longueur, est envoyé pour le séquençage. Les peptides internes sont obtenus après digestion de la protéine par l'endoprotéase Lys-C (sequencing grade Boehringer). La protéine dans le gel de polyacrylamide est digérée dans 150 µL de tampon Tris-HCl pH 8,6 (0,1 M) contenant 0,03% de SDS, à 35°C pendant 18 heures en présence de 0,4 µg d'endoprotéase Lys-C. 25 La protéine digérée est injectée sur colonne HPLC DEAE-C18 (diamètre 1 mm); les peptides sont élusés en utilisant un gradient d'acetonitrile (de 2 à 75 %) contenant du TFA à 0,1%. L'endoprotéase Lys-C clive spécifiquement les polypeptides du côté carboxylique des lysines.

#### I.1.5.1- Validation théorique en utilisant le gène *MndD* d'*Arthrobacter globiformis*

Une partie (867 pb) du gène *MndD* est amplifié par PCR en utilisant les amores 'OZ-MndD-S711': ACGTCACCGA AGAGGATGAA AAC et 'OZ-MndD-AS1578': ACGGCCATTG CGGACTTTTC. La PCR est réalisée en utilisant le programme suivant:

95°C 5 min; 25 cycles: 95°C 45 sec, 56°C 45 sec; 72°C 1 min; 72°C 5 min; 4°C en attente. Le mélange réactionnel comprend 200 à 500 µM de dNTP, 20 à 200 ng d'ADN cosmique ou génomique et 100 pmol de chaque amorce dans un volume final de 50 µL.

5 I.1.5.2- Identification par PCR d'une partie du gène codant l'HPP-oxydase

La PCR est réalisée en utilisant le kit 'Advantage®-GC Genomic PCR' (Clontech). Ce kit comprend, entre-autres, un adjuvant à base de bêtaïne 'GC melt' et un mélange de polymérases thermorésistantes - principalement avec de la *Thermus thermophilus* (*Tth*) -. L'amplification est réalisée sur l'ADN génomique d'*Arthrobacter globiformis*, en utilisant la programmation suivante : 94°C 5 min; 30 cycles: 94°C 20 sec, 60°C 30 sec, 72°C 3 min; 72°C 6 min; 4°C en attente. Les conditions réactionnelles sont 400 µM dNTP, 50 ng d'ADN génomique, 100 pmol de chaque amorce, 'GC melt' 1X, pour un volume réactionnel de 50 µL. Dans ces conditions, nous amplifions une bande de 937 pb que nous dénommons Z2.

10 15 L'amplification par PCR peut être aussi réalisée en utilisant la *Tth* d'Epicentre ou la *Tbr* (*Thermus brockianus* - Finnzyme). La *Tbr* est la seule polymérase thermorésistante testée à pouvoir réaliser la PCR sans additifs (DMSO, glycérine, bêtaïne) ; c'est en outre une enzyme de haute fidélité.

I.1.6- Criblage de la banque cosmique

20 25 Le criblage de la banque cosmique est réalisé en utilisant la technique des sondes froides marquées à la dioxygénine (Boehringer Mannheim, 1995).

I.1.6.1- Préparation de la sonde Z2-Dig

Le marquage de la sonde à la digoxygénine est faite par PCR dans un volume final de 50 µL, dans les conditions définies au paragraphe II.5.2, sauf pour le mélange de dNTP constitué par : dUTP-Dig 90 µM; dTTP 135 µM; dATP 225 µM; dCTP 225 µM; dGTP 225 µM. On quantifie la sonde amplifiée en déposant 3 µL de la réaction sur un gel agarose à 0,8%. Il apparaît un léger bruit de fond, c'est à dire que la PCR n'est pas suffisamment spécifique. Afin d'éviter tous problèmes ultérieurs, la totalité de la PCR est déposée sur gel et la bande d'intérêt est extraite en utilisant le kit Qiaex II (Qiagen).

I.1.6.2- Transfert de la banque cosmique sur membrane Hybond N

Le stock glycérine de la banque cosmique réalisée dans *E. coli* HB101 est utilisé pour inoculer 2 mL de milieu LBT<sup>15</sup>. Après 8 heures de croissance la DO<sub>600</sub> est

estimée; des dilutions en cascade sont réalisées afin d'étaler environ 1000 clones par boîte (144 cm<sup>2</sup>). Après 16 heures de croissance à 37°C, les bactéries sont transférées sur des membranes Hybond N (Amersham) et lysées en suivant les recommandations de Boehringer Mannheim (1995). L'ADN libéré est fixé à la membrane par exposition aux U.V. (120 mJ délivrés en 45 sec – Stratalinker ; Stratagène). Les membranes sont débarrassées des débris cellulaires en réalisant le traitement à la protéinase K comme préconisé par Boehringer Mannheim (1995).

#### I.1.6.3- Préhybridation - hybridation - détection

Les étapes de préhybridation et hybridation se font dans un sac disposé sur un plateau à bascule, en utilisant la technique d'hybridation avec la sonde marquée à la digoxigénine (Boehringer Mannheim, 1995). La préhybridation (5x SSC; 0,5% SDS; 0,1% N-laurylsarcosine; 1% agents bloquants (Boehringer Mannheim, ref: 1096 176); 100 µg.mL<sup>-1</sup> sperme de saumon soniqué et dénaturé) est réalisée pendant 4 heures à 65°C. L'hybridation de la membrane est faite pendant la nuit à 68°C (milieu de préhybridation frais contenant 20 ng.mL<sup>-1</sup> de sonde marquée à la digoxigénine et dénaturée pendant 5 min à 100°C). Le lendemain, l'excès de sonde et les hybridations aspécifiques sont éliminées par quatre lavages avec le tampon A (0,5x SSC ; 0,1% SDS, 65°C). Les membranes sont alors équilibrées pendant 5 min à température ambiante dans le tampon B (acide malique 138 mM, NaCl 142 mM, ajusté à pH 7,5 avec des pastilles de soude, 0,3% tween 20). Puis elles sont saturées par des agents bloquants (Boehringer Mannheim) durant 30 minutes avant d'être hybridées avec l'anticorps Anti-Digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline ('Anti-Digoxigénine-AP, Fab fragments' ; Boehringer Mannheim) dilué au 1/10000 dans une solution fraîche d'agents bloquants. Après 30 minutes, les membranes sont rincées deux fois 15 minutes dans du tampon B, puis équilibrées 5 minutes dans le tampon réactionnel de la phosphatase alcaline (Tris 0,1 M; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 0,05 M pH 9,5). Les membranes sont recouvertes avec 1 mL de CSPD prêt à l'emploi puis incubées 15 min à 37°C. Cette étape à 37°C permet une activation rapide de la phosphatase alcaline couplée à l'anticorps. On révèle les membranes en exposant des Hyperfilm® ECL (Amersham) pendant 1 à 15 minutes.

#### I.1.6.4- Analyse des cosmides positifs par Southern et PCR

Les cosmides identifiés lors de l'hybridation sur membrane sont confirmés par PCR et par la technique de Southern. Dans ce cas, l'ADN cosmidique, purifié par lyse alcaline (Maniatis *et al.*, 1982), est digéré par des enzymes de restriction puis séparé sur

gel d'agarose à 0,8 %. Les gels sont transférés sur membrane Hybond N<sup>+</sup> (Amersham) par la technique de Southern en 20x SSC (Ausubel *et al.*, 1995). Après transfert, la membrane est rincée au 2x SSC, puis l'ADN est fixé à la membrane grâce aux U.V. (120 mJ délivrés en 45 sec – Stratalinker ; Stratagène). La membrane est alors révélée en utilisant la technique de sonde froide décrite précédemment.

#### I.1.7- Vecteurs de clonage et bactéries hôtes

Les séquences d'ADN amplifiées par PCR sont généralement clonées dans le plasmide p-GEMT-easy (Proméga) qui permet un criblage par la technique "bleu-blanc". Pour la surexpression, on utilise le plasmide pKK223-3 (Pharmacia) qui place le gène sous la dépendance d'un promoteur *tac*. Les clonages sont généralement réalisés en utilisant *E. coli* DH5 $\alpha$  (New England Biolabs) ou *E. coli* XL1 Blue (Stratagène). Pour la surexpression on préférera *E. coli* BL21(DE3).

#### I.1.8- Activité enzymatique de l'acétolactate synthase (ALS)

L'activité acétolactate synthase (ALS) est mesurée en utilisant la méthode colorimétrique décrite par Chang et Duggleby (1997). Les réactions sont conduites en microplaques avec un volume total de 250  $\mu$ L. Pour chaque réaction, 25  $\mu$ L d'enzyme sont incubées 30 min à 37°C dans 225  $\mu$ L de milieu réactionnel constitué de KPi 50 mM pH 7,0; pyruvate de sodium 50 mM ; TPP 1 mM ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ; FAD 10  $\mu$ M. La réaction est arrêtée par ajout de 25  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %. Les microplaques alors sont incubées à 60°C pendant 15 min. Puis on ajoute 250  $\mu$ L de créatine 0,5 % et 250  $\mu$ L d' $\alpha$ -naphtol à 5 % dans du NaOH 4 M (la solution d' $\alpha$ -naphtol doit être préparée moins de 10 min avant usage). La microplaquette est alors incubée 15 minutes à 60°C puis 15 minutes à température ambiante. Une couleur rouge cerise apparaît. La lecture est réalisée à 525 nm ( $\epsilon_M = 22\,700\,M^{-1}\,cm^{-1}$ ).

### I.2- Résultats - Discussion

L'HPP oxydase est la première activité enzymatique que nous souhaitons introduire dans la plante dans le cadre de la création de la voie métabolique contournant l'HPPD. Afin de pouvoir identifier le gène codant l'activité HPP oxydase différentes approches furent développées: (1) la mutagenèse insertionnelle et donc l'identification du gène par la perte de l'activité enzymatique, (2) la complémentation fonctionnelle d'un microorganisme en utilisant une banque génomique, (3) la purification de la protéine pour remonter à la séquence nucléique. C'est la troisième voie qui a été préférée.

### I.2.1- Purification de l'HPPO

#### I.2.1.1- Optimisation des conditions de culture

Avant de commencer à purifier la protéine, il est utile de déterminer quels sont les conditions de culture qui permettent son expression dans la bactérie. Les résultats 5 d'optimisation des conditions de culture montrent que l'activité HPP oxydase n'est pas détectable lorsque la croissance d'*A. globiformis* est faite au dépend d'une source de carbone telle que le succinate, le fumarate ou le glucose. Par contre l'activité HPP oxydase est détectée lorsqu'*A. globiformis* est cultivé en utilisant l'HPP, la tyrosine ou la phénylalanine comme seule source de carbone. Si l'on augmente la quantité d'extrait 10 de levure (par exemple 200 mg.L<sup>-1</sup> au lieu de 20 mg.L<sup>-1</sup>) on observe une diminution de l'activité enzymatique produite. Sur la base de ces observations, le milieu M<sup>Ag</sup> est défini. Enfin, on observe qu'une culture à forte densité (en début de phase stationnaire ; DO<sub>600</sub> ~ 1) présente une activité enzymatique HPP oxydase plus faible que dans le cas d'une culture en phase exponentielle de croissance (DO<sub>600</sub> ~ 0,4).

#### I.2.1.2- Tests préliminaires

Nous venons de définir le milieu optimal pour la production de l'HPPO, nous allons maintenant rechercher les conditions qui n'altèrent pas la stabilité de l'activité HPP oxydase lors des processus de purification. Pour les chromatographies impliquant les résines échangeuses d'anions et les chromatographies en fonction du pH, il est 20 important de connaître la sensibilité de l'enzyme au pH et aux sels. Nous observons que le pH optimum est compris entre pH 7,0 et 7,8 ainsi que l'avait déjà démontré Blakley (1977). L'enzyme semble peu sensible aux sels (NaCl et KCl) puisqu'il faut des concentrations supérieures à 750 mM pour observer une baisse de l'activité enzymatique. Nous connaissons maintenant les conditions permettant une bonne 25 expression de l'activité enzymatique et nous avons déterminé la sensibilité de l'activité HPP oxydase à des facteurs pouvant intervenir lors de la purification. La purification de l'HPPO peut donc commencer.

#### I.2.2.3- Purification de l'HPPO

Pour purifier l'HPPO, on applique le protocole décrit précédemment. L'activité 30 enzymatique est éluee de la DEAE EMD 650S avec 150 à 200 mM de NaCl en solution dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les fractions contenant l'activité enzymatique sont rassemblées et conservées pendant la nuit à 4°C. En effet la congélation à cette étape entraîne une perte d'activité. Les protéines sont ensuite

chargées sur une résine Source Q. L'activité enzymatique est alors éluée avec une concentration en NaCl comprises entre 150 et 200 mM en solution dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les fractions contenant l'activité enzymatique sont rassemblées puis concentrées sur membrane UVIKON 10 kDa, et conservées à 4°C pendant la nuit. Enfin l'HPPO est purifiée lors d'une troisième étape en appliquant un gradient phosphate sur colonne d'hydroxyapatite. L'activité est éluée avec une concentration de phosphate voisine de 30 mM. Les fractions contenant l'activité enzymatique HPP oxydase, en sortie de colonne d'hydroxyapatite, sont alors analysées sur un gel SDS-PAGE à 8,5% coloré au nitrate d'argent. Le gel présente l'évolution de deux bandes protéiques. Par comparaison entre le profil d'activité enzymatique et le profil d'élution des protéines, nous considérons que l'HPPO correspond à la protéine de plus haut poids moléculaire (environ 60 kDa). Dans l'essai présenté, la purification est initiée avec 1,5 g de protéines solubles extraites d'*A. globiformis* et nous avons récupéré 150 µg d'un mélange de protéines (dont environ 70 µg d'HPPO). Le facteur de purification en terme d'activité spécifique n'a pas été déterminé. En effet, nous utilisons des conditions de réaction totale pour suivre l'élution de l'activité enzymatique. En outre, la problématique était davantage l'identification de la protéine que la mise au point d'un protocole de purification. L'analyse HPLC, des réactions faites au sortir de chaque étape de purification, montre l'apparition d'un produit qui présente le même temps de rétention que le standard 4-HPA (SIGMA). Quarante picomoles de la protéine HPPO (60 kDa) sont transférées sur une membrane PVDF et sont envoyées pour le séquençage en même temps que 40 pmol de la protéine incluse dans le gel d'acrylamide. Les protéines transférées sur membranes servent à déterminer la séquence N-terminale tandis que les protéines incluses dans le gel sont utilisées pour déterminer la séquence de peptides internes.

#### I.2.2.4- Résultats de séquençage de l'HPPO

Peu de peptides internes sont obtenus en sortie d'HPLC après digestion de l'HPPO par l'endoprotéase Lys-C. Ce résultat suggère que la protéine contient peu de lysine, en effet l'endopeptidase Lys-C coupe après les lysines. Si la lysine est peu fréquente, la digestion par l'endopeptidase K génère des fragments peptidiques longs qui restent adsorbés dans la colonne et ne peuvent pas être élués, même en utilisant des conditions très hydrophobes. En se basant sur la forme des pics chromatographiques ainsi que sur la quantité apparente, on sélectionne puis on séquence trois peptides. Leur

dénomination est fonction de leur ordre de sortie de la colonne HPLC: peptide N°4, peptide N°6, peptide N°11. Leur séquence est respectivement: (A) WWAEALK, AAAGRILRLL DDAAGANASK, XDNRFTAVDF XT (où X est un acide aminé non déterminé). La séquence des 30 premiers acides aminés N-terminaux est obtenue avec un rendement initial de 40 %: TSLTVSGRVA QVLSSYVSD VFGVMGNGNV Y. L'acide aminé (méthionine ou valine) correspondant au codon initiation (ATG ou GTG) n'est pas retrouvé. Le rendement initial obtenu (15 pmol équivalent BSA), comparé avec celui obtenu pour les peptides internes (30 à 35 pmol équivalent BSA), suggère qu'une partie des protéines étaient bloquées en N-terminal. La séquence N-terminale et les séquences internes obtenues ne présentent aucune homologie dans les bases de données. En nous basant sur les séquences peptidiques obtenues, des oligonucléotides dégénérés sont synthétisés afin d'identifier le gène *HPPO* par PCR.

### I.2.3- Validation des techniques PCR et identification d'une partie du gène *hppO*

#### 15 I.2.3.1- Validation des techniques PCR

La teneur en base guanine et cytosine (GC %) de la majorité des ADN génomiques des *Arthrobacter sp.* est comprise entre 59 et 66 %, cependant il est de 67 à 69 % pour *A. agilis* (anciennement *Micrococcus agilis*) (Koch *et al.*, 1995), de 70 % pour *A. atrocyaneus* (Jones *et al.*, 1991) et de 73 % pour un *Arthrobacter sp.* identifié dans les glaces arctiques (Junge *et al.*, 1998). Ces fortes teneurs en guanine et cytosine peuvent rendre plus difficile la mise en œuvre de la PCR. Pour cette raison que nous avons validé nos méthodes PCR (ADN génomique, polymérases, ...) en utilisant le gène codant la 'Manganese dependent Dioxygenase' (*MndD*) d'*Arthrobacter globiformis* (Boldt *et al.*, 1995). Cette enzyme de la voie de dégradation de l'HPP catalyse l'ouverture du cycle aromatique du 3,4-dihydroxyphénylacétate. Pour l'amplification contrôle du gène *MndD*, nous avons testé des polymérases thermorésistantes de *thermophilus aquaticus* (Taq) commercialisées par différents fournisseurs (Perkin Elmer, ATGC, Appligène, Qiagen, Sigma). Dans tous les cas, l'amplification du gène *MndD* est obtenue. Cependant, dans des conditions équivalentes, en utilisant les amores dégénérées codant les peptides de l'HPPO, l'amplification du gène *hppO* n'est pas obtenue même en utilisant des additifs (DMSO, glycérol).

#### 1.2.3.2- Identification par PCR de la partie N-terminale du gène *hppO*

Nous amplifions de manière spécifique une séquence d'ADN de 936 pb qui

pourrait correspondre à la partie N-terminale du gène *hppO*. L'amplification est obtenue en utilisant d'une part les amores dégénérées OX3: TTNGCNCCNG, CNGCRTCRTC et OZ10N: GAYGTNTTYG GNGTNATGGG NAAYGG correspondant respectivement à une partie du peptide N°6 et à une partie de la séquence peptidique N-terminale et d'autre 5 part le kit 'Advantage GC Genomic PCR' (Clontech). Le kit de Clontech est conçu pour réaliser des PCR sur des génomes riches en bases GC. Il contient un mélange de polymérases thermorésistantes (dont la *Tth*) et un additif à base de bétaine. La *Tth* est une polymérase thermorésistante purifiée à partir de *Thermus thermophilus*. La dégénérescence de chaque amorce est de 1024; c'est à dire qu'une amorce sur 1024 10 présente la séquence nucléique exacte du gène recherché. La dégénérescence provient du fait qu'un acide aminé peut être codé par plusieurs codons, pour exemple, l'alanine est codée par quatre codons (GCA, GCC, GCG, CGT). Le code de dégénérescence utilisé pour les amores est défini comme suit : N = A ou T ou G ou C ; R = A ou G ; Y = T ou C. Les températures théoriques d'hybridation sont respectivement de 55,4°C et 15 57,6°C. Malgré une température d'hybridation de 60°C utilisée lors de la PCR, l'amorce OX3 seule permet des amplifications non spécifiques. Nous avons amplifié par PCR un fragment d'ADN de 936 pb de manière spécifique en utilisant deux amores dégénérées. Nous devons nous assurer que cet ADN amplifié correspond bien au gène *hppO* recherché.

#### 20 I.2.4- Caractéristique du fragment d'ADN de 936 pb

Le fragment d'ADN de 936 pb, amplifiée par PCR, est purifié sur gel d'agarose. Il est alors cloné dans pGEM-T easy, selon les instructions du fournisseur, puis séquencé. Lorsque l'on traduit la séquence nucléique obtenue, on observe qu'elle code aux deux extrémités pour la totalité du peptide N°6 et pour une bonne partie de la séquence N-terminale. Nous sommes donc sûr d'avoir amplifié une partie du gène codant la protéine purifiée et microsequencée, l'HPPO. La séquence nucléique contient 73% de bases guanine (G) et cytosine (C) on note en outre la possible formation de structures secondaires dites "en épingles à cheveux" (*stem-loop*) dans les 250 premières bases de l'ARN messager. Cette haute teneur en bases G et C ainsi que l'existence de ces 25 structures secondaires peuvent expliquer en partie les difficultés rencontrées pour parvenir à l'amplification par PCR d'une partie de ce gène. La séquence nucléique de 30 936 pb ainsi que la séquence protéique correspondante ne présentent pas d'homologies avec les séquences enregistrées dans les bases de données. Nous possédons maintenant

une séquence de 936 pb, orientée de N-terminal vers le peptide interne N°6. La protéine faisant environ 60 kDa, nous recherchons un gène d'environ 1650 pb. Il reste donc à identifier environ 700 pb. Pour cela nous allons cribler la banque génomique d'*A. globiformis* réalisée dans le cosmid pLAFR5 et amplifiée dans *E. coli* HB101.

5       **I.2.5- Criblage de la banque cosmidique d'*A. globiformis***

La banque génomique réalisée est transférée sur membrane, puis criblée en utilisant, comme sonde, le fragment d'ADN de 936 pb marqué à la digoxygénine. Le protocole standard est adapté pour un ADN "classique" (60% AT), tandis que le fragment de 936 pb présente une proportion estimée de 23% AT. Si nous gardons le  
10 même rapport dUTP-Dig/dTTP que dans le cas d'un ADN classique nous obtenons une sonde faiblement marquée donc une détection moins sensible. Nous avons donc optimisé la proportion dUTP-Dig/dTTP nécessaire pour le marquage de la sonde (paragraphe II.7.1). Le criblage de la banque génomique a permis d'identifier quatre cosmides (Cos1A, Cos2A, Cos4A, Cos17A1) ayant des profils de restriction différents.  
15 En comparant les résultats d'hybridation de Southern obtenus à partir des cosmides avec ceux obtenus à partir de l'ADN génomique d'*Arthrobacter globiformis*, nous sélectionnons le cosmid 2A. La figure N°14 illustre la démarche utilisée en prenant pour exemple la digestion des cosmides par l'enzyme de restriction *Not I*. Nous observons tout d'abord que le vecteur cosmidique pLAFR5, digéré par *Not I*, n'hybride  
20 pas avec la sonde Z2-Dig. Par contre, nous observons que le cosmid 1A présente une seule bande d'hybridation à 2,3 kb alors que les cosmides 2A, 4A et 17A présentent deux bandes d'hybridation à 4,3 et 2,3 kb. Or la digestion du génome d'*A. globiformis* par *Not I* produit deux bandes de 4,3 et 2,3 kb; de fait nous considérons que le cosmid 1A ne contient pas toute l'information que nous recherchons. En nous basant sur  
25 d'autres restrictions et en utilisant une démarche équivalente nous éliminons les cosmides 4A et 17A. Le Cosmide 2A est alors séquencé sur une distance d'environ 3 kb de part et d'autre du site *Not I* identifié au milieu de la sonde Z2-Dig. Les résultats d'hybridation de l'ADN génomique montrent en outre que le gène est présent à une seule copie. Nous avons identifié le cosmid 2A que nous avons fait séquencer sur 6,2  
30 kb. Nous allons maintenant pouvoir analyser cette séquence d'ADN issue de génome d'*Arthrobacter globiformis*.

**I.2.6- Analyse globale de 6,2 kb d'ADN génomique d'*Arthrobacter globiformis*.**

En utilisant le logiciel Vector NtI, la position des gènes potentiels est définie à partir de la séquence nucléique de 6255 pb obtenue en séquençant le cosmid 2A. Nous retrouvons la séquence de 936 pb, identifiée par PCR, comme faisant partie d'un gène potentiel. Ce gène potentiel correspond donc vraisemblablement au gène *hppO*. Quatre autres gènes (A, B, C, D) sont potentiellement identifiés (Figure 3) en effectuant une recherche par homologie en utilisant l'algorithme BLASTX. Le gène A coderait un transporteur d'acide aminés, le gène B coderait une histidinol-phosphate aminotransférase cependant de précédents travaux montrent que cette enzyme possède l'activité tyrosine aminotransférase chez la bactérie à Gram positif *Bacillus subtilis* (Nester & Montoya, 1976), le gène C coderait un régulateur de transcription, tandis que le gène D coderait un régulateur d'opéron.

### I.2.7- Analyse du gène *hppO*

#### 15 I.2.7.1- Description générale

Sur la séquence obtenue de 6256 pb, le gène *hppO* (en vert) est délimité en 5' par le codon d'initiation ATG en position 3143 et en 3' par le codon stop TAG (en rouge) en position 4823. Le gène présente donc une longueur réelle de 1680 pb. Il présente une forte teneur en bases G et C (71,4 % GC). La recherche d'homologies au niveau des séquences nucléiques (BLASTN), ne permet aucune identification. Afin de mieux caractériser le gène, nous recherchons les éléments spécifiques de la transcription et de la traduction.

#### I.2.7.2- Eléments caractérisant la transcription et la traduction du gène *hppO*

Nous identifions les potentielles boîtes promotrices de la transcription (Figure 4). La boîte « -10 », dite « boîte de Pribnow », est située entre les positions 3082 à 3088 (AAAAATA) et la boîte « -35 » est située en position 3055 à 3059 (TTGCA). Les boîtes ainsi définies sont légèrement différentes des séquences canoniques (respectivement TATAAT et TTGACA ; Singer & Berg, 1992). Cela peut refléter une interaction faible avec les facteurs permettant la transcription constitutive ou bien la nécessaire interaction avec des facteurs de transcription différents. L'adénine en position 3096 pourrait être la base d'initiation de la transcription. Enfin nous identifions entre les positions 3068 à 3072 (TGTGA) une séquence correspondant au site d'attachement de la protéine CAP (*catabolic gene activator protein*). Le fait de retrouver ce site de

fixation de la protéine CAP va dans le sens des résultats obtenus lors de l'optimisation des conditions de culture. En conclusion la transcription du gène *hppO* est vraisemblablement sous le contrôle d'un promoteur faible, notamment régulé par le glucose. La séquence de Shine-Dalgarno (Singer & Berg, 1992) permet la fixation de la petite sous unité ribosomique. Elle est identifiée (GACGAT; en position 3131 à 3136) 5 12 bases en amont du codon d'initiation (ATG) de la traduction, par analogie avec la séquence consensus AGGA. On observe en outre que la partie 5' terminale (environ 250 bases) de l'ARN messager est capable de se structurer en épingle à cheveux (*stem-loop*). Or la structure secondaire de la région de l'ARNm qui avoisine l'ATG initiateur 10 influence l'étape d'initiation de la traduction. Ainsi l'initiation est nulle ou peu efficace lorsque l'ATG initiateur ou la séquence Shine-Dalgarno sont impliqués dans un appariement intramoléculaire. On peut donc se poser la question d'un éventuel rôle régulateur de la traduction des structures en épingle à cheveux observées.

15 I.2.7.3- Expression de l'HPPO sous la dépendance du promoteur *tac*

La surexpression de l'HPPO est intéressante pour définir les caractéristiques cinétiques, pour permettre la production d'anticorps, mais aussi en vu de l'analyse structurale. Le gène est cloné dans un vecteur pKK223-3 en deux étapes. Le gène, amplifié par PCR dans les conditions définies pour l'identification du gène *hppO* et en 20 utilisant les amorces HPP-N-sens (CATGACTTCA CTTACAGTGT CC) et HPP-C-term (CAAAC TGAGT AGCAGCTCAG G), est cloné dans le vecteur pGEMT-easy. On sélectionne le clone présentant le gène *hppO* en antisens du promoteur *lac*. On le digère alors par *Eco RI*. Ce faisant on récupère le gène *hppO* que l'on insert dans le vecteur pKK223-3 digéré par *Eco RI*. Le clone pKK3-2, présentant le gène *hppO* sous le 25 contrôle du promoteur *tac*, est retenu. Lorsque l'on induit l'expression du clone pKK3-2 par l'ajout d'IPTG, on peut détecter une activité HPP oxydase. Cependant la protéine surexprimée (57,4 kDa) n'est pas décelable dans un extrait brut séparé sur gel acrylamide dénaturant. Il reste donc à améliorer le protocole de surexpression. Nous envisageons en outre de cloner l'HPPO en fusion avec une séquence Tag, (GST, poly- 30 histidine, protéine A....) afin de faciliter la purification de la protéine surexprimée. Nous venons définitivement de montrer que le gène identifié codait une activité HPP oxydase. Cependant, en réalisant des recherches d'homologie au niveau des séquences protéiques (BLASTX ou BLASTP), nous observons que la protéine HPPO présente

jusqu'à 25% d'identité avec des acétolactate synthases (ALS), des pyruvate oxydases (POX) et des pyruvate deshydrogénases (PDH). Il est ainsi possible d'identifier des motifs très conservés tel ceux concernant la fixation du cofacteur TPP (Figure 5). En outre le profil d'hydrophobicité de l'HPPO est très proche de celui obtenu pour des ALS (non montré). Afin d'être sûr que le gène identifié code réellement l'HPPO et non pas une ALS, une POX ou une PDH ayant une activité annexe de type HPP oxydase, nous décidons de tester l'HPPO pour une éventuelle activité annexe.

#### I.2.8- HPPO versus ALS

Les recherches d'homologies protéique montrent que l'HPPO présente jusqu'à 25% d'identité avec des ALS. Ce résultat, bien que surprenant au premier abord, présente une certaine logique. En effet ces deux enzymes utilisent le FAD et le TPP comme cofacteurs réactionnels. Elles réalisent toutes deux une décarboxylation. Par ailleurs, l'un des substrats de l'ALS est le pyruvate, or notre substrat un pyruvate  $\beta$  substitué : l'hydroxyphénylpyruvate. Il est donc possible que la structure du site actif soit voisine et que par conséquence ces protéines partagent des activités enzymatiques communes. Nous avons utilisé la grande sous-unité recombinante et purifiée des ALS d'*Arabidopsis thaliana* (Chang & Duggleby, 1997) et de *E. coli* (Hill & Duggleby, 1998) pour servir de contrôle positif dans nos expériences réalisées pour rechercher une activité ALS chez l'HPPO. Les résultats obtenus montrent que l'HPPO ne présente pas d'activité ALS. Nous montrons aussi à cette occasion que les deux ALS testées n'ont pas d'activité HPP oxydase. Enfin nous observons que l'HPPO n'est pas inhibé par 115 ppm d'imazapyr (inhibiteur d'ALS, Cyanamid). Ces résultats montrent que bien qu'en dépit de points communs (séquence protéique et hydrophobicité) les ALS et l'HPPO sont des enzymes bien distinctes, n'ayant pas d'activités enzymatiques secondaires.

#### 25 Exemple 2 IDENTIFICATION DES GENES CODANT LA 4-HPA 1-HYDROXYLASE

La 4-HPA 1-hydroxylase (HPAH) convertit le 4-HPA en HGA par une réaction d'hydroxylation accompagnée par un déplacement de la chaîne acétyle. Son activité a été caractérisée sur extraits bruts de *Rhodococcus erythropolis* S1 (Suemori *et al.*, 1995) ou sur extrait partiellement purifiés de *P. acidovorans* (Hareland, 1975). Elle a été purifiée par Suemori *et al.* (1996) cependant les séquences protéique et génétique ne sont pas publiées. Afin de pouvoir introduire cette activité enzymatique dans la plante, il est nécessaire d'identifier le gène.

Différentes approches sont envisageables: (1) la complémentation phénotypique et/ou fonctionnelle en utilisant une banque génomique, (2) la mutagenèse insertionnelle et donc l'identification du gène par la perte de l'activité enzymatique, (3) la purification de la protéine pour remonter à la séquence nucléique. Nous avons choisi de développer 5 ces trois approches avec *Pseudomonas acidovorans* car il y a de nombreux outils de biologie moléculaire dont l'efficacité a été démontrée sur différentes espèces et souches de *Pseudomonas*. A titre d'exemples nous pouvons citer le transposon mini-Tn5 (De Lorenzo *et al.*, 1990), les vecteurs large spectre d'hôte tels pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994, 1995; D'Souza *et al.*, 2000), les techniques de transfert par conjugaison. Le 10 transposon mini-Tn5 peut être utilisé soit pour perturber un gène (de Lorenzo *et al.*, 1990 ; Fedi *et al.*, 1996 ; Campos-Garcia *et al.*, 2000) soit pour introduire un gène dans le génome bactérien (Prieto *et al.*, 1999). Nous avons commencé par l'approche par la complémentation phénotypique car c'est ce qui paraissait le plus rapide et le plus simple. Cette approche a été suivie par les deux autres simultanément. Cependant, nous 15 n'aborderons pas ici l'approche par mutagenèse insertionnelle, cette voie n'ayant pas été exploitée par la suite.

### **III.1- Matériels et Méthodes**

#### **III.1.1- Construction d'une banque génomique de *P. acidovorans* dans *E. coli***

Pour construire la banque nous utilisons le cosmide pLAFR5 et l'ADN génomique 20 de *P. acidovorans*. Nous utilisons la souche hôte *E. coli* HB101.

#### **III.1.2- Purification de la 4-HPA 1-hydroxylase**

##### **II.1.2.1- Test d'activité spectrophotométrique**

Dans la réaction catalysée par la 4-HPA 1-hydroxylase, décrite par Hareland *et al.* (1975), il y a consommation d'oxygène moléculaire et de NADH<sub>2</sub>H<sup>+</sup>. Nous avons 25 choisi de mesurer l'activité enzymatique en suivant l'oxydation du NADH<sub>2</sub>H<sup>+</sup> en NAD<sup>+</sup>. Le milieu réactionnel comprend: NADH<sub>2</sub>H<sup>+</sup> 300 µM; FAD 6,7 µM; KPi 100 mM; DTT 1 mM; 10 à 50 µg de protéines. La réaction est déclenchée par l'ajout du substrat: 4-HPA 1 mM. La réaction est suivie à 340 nm ou à 292 nm pendant 2 à 10 min. En effet, la consommation du NADH<sub>2</sub>H<sup>+</sup> se traduit par une diminution de l'absorbance à 340 nm 30 tandis que la production d'homogentisate se traduit par une augmentation de l'absorbance à 292 nm. Le test spectrophotométrique est très rapide, il est utilisé en routine pour suivre l'éluion des protéines lors des étapes de purification.

##### **II.1.2.1- Test d'activité HPLC**

L'analyse des réactions enzymatiques par HPLC permet de confirmer la production d'HGA (temps de rétention, spectre UV). Le test enzymatique est réalisé dans les mêmes conditions que ci-dessus. Cependant la réaction est arrêtée par ajout d'un tiers de volume d'acide perchlorique 20%. Les réactions sont alors analysées par 5 HPLC en élution isocratique avec 90% de phase A et 10 % de phase B ou 92% de phase A et 8% de phase B. La phase A est de l'eau milli Q contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) et la phase B correspond à de l'acetonitrile. Dans l'élution en isocratique 90% - 10%, l'HGA est élué en 1,2 min alors qu'en système isocratique 92% - 8% il est élué en 1,4 min. L'élution est enregistrée généralement à 230 nm. Van den 10 Tweel *et al.* (1986) ont utilisé le 2,2'-bipyridyl (inhibiteur de protéine à fer non hémique) pour inhiber l'homogentisate dioxygénase et ainsi permettre l'accumulation de l'HGA. Pour cette raison, nous ajoutons dans certains milieu réactionnel 2 mM de 2,2'-bipyridyl. Dans ces conditions chromatographiques, il est possible d'identifier le 4-HPA et l'HGA. La chaîne HPLC est constituée d'une HPLC Alliance 2690 (Waters) et d'un 15 détecteur à barette diode 996(Waters).

#### II.1.2.3- Purification de la protéine HPAH

*Pseudomonas acidovorans* est cultivé 48 heures sur milieu M63 contenant du 4-HPA comme seule source de carbone, à 29°C, 220 rpm. Les bactéries sont centrifugées 20 à 3 000 g pendant 15 min à 6°C (Beckmann J2/21 M/E centrifuge). Le culot bactérien est repris dans le tampon de sonication (KPi 0,1 M pH 7,2; MgSO<sub>4</sub> 1mM; DTT 1mM; benzamidine hydrochloride 1 mM; acide caproïque 5 mM). La benzamidine hydrochloride et l'acide caproïque sont des inhibiteurs de protéases. La sonication est réalisée pendant 9 minutes en sonicant toutes les quarante secondes pendant vingt 25 secondes à la puissance 5 (Vibra Cell, Sonic Materials INC., Connecticut, USA). Durant la sonication, l'échantillon est maintenu à la température de la glace fondante. L'extrait soniqué est centrifugé à 15 000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant récupéré est précipité avec 1 % de sulfate de streptomycine. Le précipité est éliminé par centrifugation à 15 000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est dessalé sur colonne 30 PD10 (Pharmacia) puis chargé sur colonne DEAE/EMD 650 S équilibrée en tampon A (KPi 20 mM pH 7,2, glycérol 10 %, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, DTT 1 mM). L'élution se fait en utilisant un tampon B (tampon A; KCl 1 M; 100 µM FAD). L'activité 4-HPA 1-hydroxylase est éluée pour une concentration en KCl voisine de 150 mM. Les fractions

actives, concentrées sur membrane UVIKON 10 kDa puis dessalées sur colonne PD10, sont alors déposées sur une colonne d'affinité Red (Red 120 Agarose type 3000 CL, SIGMA Ref R-0503) équilibrée en tampon A (ci dessus). L'élution est réalisée en deux étapes. La première est un lavage de la colonne Red en utilisant le tampon A enrichi avec du FAD 50 µM final. La deuxième permet l'élution de la protéine; pour cela le tampon A est enrichi en FAD (3 mM) et en NADH<sub>2</sub>H<sup>+</sup> (10 mM). Les fractions, contenant la protéine d'intérêt, sont rassemblées, concentrées et congelées à -80°C.

#### **II.1.3- Microséquençage protéique de l'extrémité N-terminale et de peptides internes**

Le même protocole que celui décrit dans le cas de l'HPP oxydase a été utilisé pour réaliser le séquençage de la protéine purifiée. Cependant, pour produire les peptides internes, la protéine a été digérée à la trypsine au lieu de l'endopeptidase Lys-C. La trypsine coupe après les arginines et les lysines. La digestion par la trypsine conduit généralement à l'obtention de fragments plus petits que ceux obtenus lors d'une digestion par l'endopeptidase Lys-C. Afin de pouvoir séquencer avec précision les peptides récupérés, il est parfois nécessaire de repurifier par HPLC les peptides récupérés.

#### **II.1.4- Identification d'une partie du gène codant l'HPAH par PCR dégénérée**

Pour la synthèse des amorces dégénérées on utilise le code de dégénérescence présenté en page 43. La PCR est réalisée dans un volume final de 50 µL, dans des tubes de 200 µL. La solution réactionnelle contient le tampon Perkin Elmer, 250 µM dNTP, 50 ng d'ADN génomique de *P. acidovorans*, 2 unités enzymatiques d'AmpliTaq (Perkin Elmer). La réaction est réalisée en utilisant un thermocycleur "Hybaid Touchdown": 3 min à 94°C, puis quarante cinq cycles : 30 sec à 94°C, 1 min à 50°C, 1 min 30 sec à 72°C, suivi d'une élongation finale de 5 min à 72°C avant de revenir à 4°C. La PCR est évaluée après dépôt de 10 µL sur gel 1% agarose. Dans ces conditions une bande de 536 pb est identifiée.

#### **II.1.5- Criblage de la banque cosmidique de *P. acidovorans***

Etalement de la banque cosmidique sur milieu LBT<sup>15</sup> et croissance pendant 16 h 00 à 37°C. Les boîtes sont alors transférées à 4°C. Au bout d'une heure, les colonies sont transférées sur membranes Hybond N (Amersham) selon la méthode de Grunstein & Hogness (1975). Les membranes sont hybridées en utilisant le fragment PCR-de 536 pb

- précédemment identifié et purifié. La détection est réalisée en  $^{32}\text{P}$ . La sonde est marquée en utilisant le kit « DNA Ready to Go » (Pharmacia). La pré-hybridation, l'hybridation et les lavages sont réalisés en ampoules. Les membranes sont pré-hybrides dans une solution composée de SSC 5x, Denhardt 6%, SDS 0,5% pendant 4 heures à 68°C.
- 5 L'hybridation est réalisée pendant 16 heures à 68°C. Les lavages sont effectués à 65°C en SSC 2x, SDS 0,1%. Les membranes sont révélées en exposant des films Kodak ou Amersham.

### II.1.6- Milieux de croissance de *P. putida*

*Pseudomonas putida* est cultivé sur milieu riche de Luria-Bertani (LB) ou 2YT contenant 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de rifampicine. En fonction des besoins d'autres antibiotiques sont ajoutés (exemple : tétracycline à 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Le milieu minimum M63 contenant 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de 4-HPA comme seule source de carbone est utilisé pour tester la complémentation fonctionnelle. Dans ce cas les antibiotiques sont omis. Toutes les cultures sont réalisées à 29°C.

### II.1.7- Transformation de *P.putida* par électroporation

1 litre de milieu LB Rifampicine (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) est inoculé avec une culture de *P. putida* mise en croissance à 29°C pendant environ 16 heures en agitation à 180 rpm. Lorsque la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  est voisine de 1,2, les cellules sont collectées par centrifugation pendant 15 min à 3 000 g, 4°C. Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont 20 reprises avec 400 mL de glycérol 10% à 4°C. Les cellules sont centrifugées une nouvelle fois à 3000 g, 20 min, 4°C. Deux nouvelles étapes de lavage sont effectuées avec respectivement 200 puis 100 mL de glycérol 10%, 4°C. Enfin, les bactéries sont reprises par 3 à 10 mL de glycérol 10% puis réparties en aliquotes de 100  $\mu\text{L}$  immédiatement congelées dans l'azote liquide. Les bactéries ainsi préparées se 25 conservent au moins six mois à -80°C. Lors de la préparation, on observe une perte de bactéries due à la lyse. L'ADN cosmique ( $\text{Tet}^R$ ) est introduit par électroporation dans les *P. putida* ( $\text{Rif}^R$ ). L'électroporation (Bio-Rad Gene Pulser<sup>TM</sup>) de 80 ng d'ADN cosmique dans 100  $\mu\text{L}$  *P. putida* électrocompétentes se fait en cuvette d'électroporation de 2 mm sous une tension de 0,9 volt avec une résistance de 30 l'électroporateur de 200  $\Omega$ . Dans ces conditions, la constante de temps  $\tau$  est d'environ 4,5 msec. Après le choc électrique, les cellules sont reprises avec 900  $\mu\text{L}$  de LB et mise en culture pendant 1h30 à 29°C, 180 rpm. Les *P. putida* transformées sont sélectionnées sur milieu gélosé LB Rif<sup>100</sup> Tet<sup>15</sup>.

### **II.1.8- Modification du vecteur large spectre d'hôte pBBR1MCS-Gm<sup>R</sup>**

Nous avons utilisé les vecteurs à large spectre d'hôte à Gram négatif de la série des pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994, 1995). Ces plasmides, qui possèdent une origine de réPLICATION de *Bordetella bronchiseptica*, se répliquent à environ 20-30 copies par 5 cellule chez *E. coli*. Ils contiennent deux sites *Not I*. Afin de faciliter les clonages ultérieurs on supprime le site *Not I* présent hors du multi-site de clonage (MCS) sur le plasmide pBBR1MCS-Gm<sup>R</sup>. Pour cela, le plasmide est coupé par *Sfi I* (50°C) puis traité à la T4 DNA polymérase afin d'obtenir des bouts francs. Le plasmide est religué sur lui même (T4 DNA Ligase - New England Biolabs). Après ligation (16 heures, 16°C), une 10 digestion par *Sfi I* est réalisée afin d'éliminer les éventuels plasmides "sauvages"; puis on électropore *E. coli* DH5α. L'ADN plasmidique est isolé des clones sélectionnés sur milieu LB Gm<sup>20</sup>. Les ADN plasmidiques sont caractérisés par deux digestions: *Not I* et *Not I/Bgl II*. Un clone est retenu: pBBR1MCS-Gm-Not-U.

### **II.1.9- Sous-clonage du Ccos8 dans pBBR1MCS-Gm-U**

Le cosmid Ccos8 est restreint par *Not I* puis déposé sur gel agarose. Après 15 migration, 6 bandes d'ADN sont visualisées : 1,7 – 3 – 4 – 5 – 8 – 10 kbp. Les bandes sont purifiées par Quiaex II. Par ailleurs, pBBR1MCS-Gm-Not-U est restreint par *Not I*, déphosphorylé en utilisant la phosphatase alcaline de crevette (S.A.P.; shrimp alkaline phosphatase). Les différentes bandes sont alors liées (T4 DNA ligase, 16 heures, 16°C) 20 dans le vecteur en utilisant des rapports "insert/vecteur" variables. Les produits de ligation sont transformés dans *E. coli* DH5α.

### **II.1.10- Conjugaison tri-parentale entre *E. coli* et *P. putida***

Afin de transférer les différents sous-clones de Ccos8 (Gm<sup>R</sup>) de *E. coli* DH5α vers *P. putida* (Rif<sup>R</sup>), on opère par conjugaison tri-parentale sur filtre en utilisant le protocole 25 décrit par De Lorenzo *et al.* (1990). Les bactéries récupérées sont étalées sur LB Rif<sup>100</sup>Gm<sup>20</sup> et sur M63 ayant le 4-HPA comme seule source de carbone.

### **II.1.11- Elimination du plasmide p5kbC**

Pour éliminer rapidement le plasmide p5kbC de *P. putida*, nous utilisons la stratégie des origines de réPLICATION incompatibles et nous forçons la perte du p5kbC à 30 l'aide d'antibiotiques. On transforme *P. putida* (Rif<sup>100</sup>) complémenté par le plasmide p5kbC (Gm<sup>R</sup>) avec pBBR1MCS Kn<sup>R</sup>. Les clones obtenus (Rif<sup>100</sup> Gm<sup>R</sup> Kn<sup>R</sup>) sont vérifiés pour leur activité de complémentation. Les clones sont alors cultivés sur deux milieux : LB Rif<sup>100</sup> Kn<sup>150</sup> Gm<sup>20</sup> et LB Rif<sup>100</sup> Kn<sup>150</sup>. Ce faisant nous maintenons la pression de

sélection pour p5kbC et pBBR1MCS Kn<sup>R</sup> ou bien seulement pour pBBR1MCS Kn<sup>R</sup>. Les croissances sont réalisées à 29°C. Le repiquage est réalisé tous les trois jours. Au huitième repiquage, les colonies sont repiquées sur 4 milieux différents (M63, M63 + 4-HPA, LB Rif<sup>100</sup> Kn<sup>150</sup> Gm<sup>20</sup> et LB Rif<sup>100</sup> Kn<sup>150</sup>) quelle que soit la boîte d'origine. L'état de croissance est alors relevé au bout de 2 et 7 jours.

### II.1.12- Identification des protéines participant à l'activité enzymatique.

#### II.1.12.1- Préparation d'extraits bruts de *P. putida*

Deux clones *P. putida* sont cultivés sur LB Gm<sup>20</sup> pendant 24 heures. Le premier comporte le plasmide pBBR1MCS-Gm-Not-U tandis que le second contient le plasmide de complémentation p5kbC. Après sonication dans un tampon (KPi 0.1 M; MgSO<sub>4</sub> 1mM; DTT 1mM; benzamidine hydrochloride 1 mM; acide caproïque 5 mM), puis centrifugation à 20 000 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est testé pour son activité 4-HPA 1-hydroxylase en utilisant les deux méthodes de mesure de l'activité enzymatique. Les extraits bruts sont, en outre, analysés par SDS-PAGE à 10%.

#### II.1.12.2- Transfert sur membrane, Séquençage N-terminal

Le séquençage est réalisé comme en exemple I.

#### II.1.12.3- Gel Filtration S75

L'éluat (5 mL) est concentrée d'un facteur 10 en utilisant un Macrosep™ 10 K (Pall Filtron) pendant deux heures à 4°C. Les 500 µL concentrés sont injectés sur une colonne de gel filtration Superdex™ 75 prep grade (HiLoad 16/60, Pharmacia) préalablement équilibrée avec 700 mL de tampon (KPi 0,02 M pH 7,2; glycérol 10%; MgSO<sub>4</sub> 1 mM ; DTT 1 mM ; 4°C) à un débit de 0,7 mL·min<sup>-1</sup>. La chromatographie est réalisée à 4°C avec un débit de 1 mL·min<sup>-1</sup>. Les fractions sont collectées toutes les minutes et conservées à 4°C.

#### II.1.12.4- Construction de pBBR1MCS FT12Δ1

Pour construire le plasmide pBBR1MCS FT12Δ1 on utilise une stratégie de clonage en deux étapes. Le plasmide p5kbC est digéré par *Nsi* I et *Not* I. L'insert obtenu, codant les gènes 1, *hpaH* et 3, est alors cloné dans pBBR1MCS-Gm-Not-U digéré *Pst* I et *Not* I. Le clone résultant, dénommé pBBR1MCS FT12, est restreint par *Hind* III et *Asc* I, puis rendu bout-francs et enfin religué. Ce faisant, les gènes 1 et 3 sont détruits et le gène *hpaH* se trouve sous la dépendance du promoteur *lac* du vecteur originel. Nous obtenons ainsi le plasmide pBBR1MCS FT12Δ1 (Figure 6).

#### II.1.12.5- Construction de pL11ac2

Le laboratoire possède un plasmide dénommé "Clone L". Cette construction correspond au clonage du promoteur et du gène de l'HPPD de *P. fluorescens* dans le vecteur pBBR1MCS-Kn<sup>R</sup>. Le promoteur du gène HPPD est fonctionnel chez *P. putida* et chez *E. coli*. Le plasmide "Clone L" est digéré par *Bam* HI et *Hin* dIII ce qui permet de récupérer l'insert contenant le promoteur et le gène HPPD de *P. fluorescens*. Cet insert est alors ligué dans le vecteur pBBR1MCS-Gm<sup>R</sup> digéré par *Bam* HI et *Hin* dIII. Le clone résultant est dénommé pBBRG-L-HPPD. Le plasmide obtenu, digéré par *Neo* I pour éliminer le gène codant l'HPPD, est ligué avec le gène *hpaC* amplifié par PCR et digéré par *Afl* III. La construction obtenue est appelée pBBRG-L-ORF1. Pour l'amplification du gène *hpaC* par PCR, on utilise des amores qui permettent d'introduire un site *Afl* III en début et en fin de gène (le site *Afl* III est compatible avec le site *Not* I). Les amores utilisées sont : en 5' du gène : GCAGGATGCA CATGTCCACC AAGAC et en 3' du gène : CGGACGCCGA CATGTATCAG CCTTC. La PCR est réalisée en utilisant 1 unité de KlenTaq polymérase (Sigma), 250 µM de dNTP, 200 nM de chaque amorce et 50 ng du plasmide p5kbC. Le programme de PCR est défini comme suit sur Perkin Elmer 9600 : 3 min à 95°C ; puis 20 cycles : 94°C pendant 1 min, 60°C pendant 30 sec, 68°C pendant 3 min ; enfin une dernière étape de 10 min à 68°C est réalisée. Le plasmide pBBR1MCS FT12Δ1 précédemment obtenu est restreint par *Ssp* I et *Not* I. Le site *Not* I est rendu franc par traitement avec la *Pfu*. Le fragment récupéré (2468 pb), contenant le gène *hpaH* sous la dépendance du promoteur *lac*, est ligué dans pBBRG-L-ORF1 digéré par *Ssp* I. Le clone présentant les gènes *hpaC* et *hpaH* en antisens est retenu, il est nommé pL1lac2. Tous ces clonages sont réalisée dans *E. coli* DH5 $\alpha$ .

## II.2- Résultats

Différentes approches sont envisageables pour identifier le gène codant l'activité 4-HPA 1-hydroxylase de *P. acidovorans*. Nous décidons dans un premier temps d'utiliser une approche par coloration phénotypique. Cette approche paraît simple et rapide. En effet, nous possédons au laboratoire un outil de criblage phénotypique pour détecter la production d'HGA. Or l'enzyme que nous recherchons convertit le 4-HPA en HGA.

### II.2.1- Approche par coloration phénotypique

Nous avons observé au laboratoire qu'*E. coli* K12 ne peut pas croître en utilisant la tyrosine ou le 4-HPA comme seule source de carbone. Nous savons d'autre part qu'*E.*

*coli* K12 possède l'activité tyrosine aminotransférase qui permet la synthèse de tyrosine à partir d'HPP. Cette activité enzymatique est réversible, la cellule peut donc produire de l'HPP à partir de la tyrosine. Si le milieu riche de culture est enrichi en tyrosine (1 g.L<sup>-1</sup>), la tyrosine est importé dans les bactéries qui l'accumulent puis la transforme en 5 HPP, selon la constante d'équilibre de la réaction de conversion entre HPP et tyrosine. Au laboratoire, nous avons déjà observé que si nous introduisons l'HPPD de *P. fluorescens* dans *E. coli* K12 alors l'HPP produit lors de la désamination de la tyrosine, est transformé en homogentisate (HGA). La réaction catalysée par l'HPPD étant irréversible, l'HGA s'accumule dans la cellule où il s'oxyde puis polymérisé 10 spontanément pour former un pigment ochronotique présentant une coloration brune. Nous avons donc là un moyen de détecter la production d'HGA. La 4-HPA 1-hydroxylase recherchée convertit le 4-HPA en HGA. On étaie donc les *E. coli* HB101 contenant la banque génomique de *Pseudomonas acidovorans* sur milieu gélosé 2YT enrichi en 4-HPA. Après deux jours, deux colonies brunissent : elles produisent donc de 15 l'homogentisate. Cependant, les activités enzymatiques réalisées sur les extraits bruts de ces deux clones révèlent une activité enzymatique de type HPPD alors que l'activité 4-HPA 1-hydroxylase recherchée est discrète, voire inexistante. A priori cette approche a permis de sélectionner les clones dont le cosmid contient le gène codant une HPPD de *P. acidovorans* et non pas la 4-HPA 1-hydroxylase. Lors de l'étude préliminaire *in vitro* 20 sur les extraits bruts de *P. acidovorans*, l'activité HPPD n'a pas été identifiée. On peut supposer que l'activité HPPD de *P. acidovorans* s'exprimerait lorsque la bactérie est cultivée sur milieu riche tandis que l'activité 4-HPA 1-hydroxylase s'exprimerait lorsque le 4-HPA est la seule source de carbone. Cette approche ne permettant pas l'identification de la 4-HPA 1-hydroxylase nous décidons de purifier l'enzyme. Une fois 25 la protéine identifiée, il sera possible de remonter au gène correspondant.

### II.2.2- Purification de la 4-HPA 1-hydroxylase

Pour suivre la purification de la protéine, nous utilisons le dosage de son activité NADH,H<sup>+</sup> oxydase dépendante du 4-HPA. Nous purifions ainsi la protéine à quasi homogénéité en appliquant le protocole de purification décrit précédemment. Le facteur 30 d'enrichissement de l'activité spécifique NADH,H<sup>+</sup> oxydase est généralement compris entre 50 et 100 selon les préparations. Sur SDS-PAGE, la protéine présente un poids moléculaire apparent de 60 kDa. En fait, nous observons que l'activité NADH,H<sup>+</sup> oxydase et la production d'HGA sont bien visibles en sortie de DEAE/EMD 650S. Par

contre en sortie de colonne d'affinité, la production d'HGA est très difficilement décelable; l'activité NADH,H<sup>+</sup> oxydase reste cependant dépendante de l'ajout du 4-HPA dans le milieu réactionnel. Si nous partons de l'hypothèse que l'enzyme est monomérique, la perte de l'activité catalytique permettant la production d'HGA peut 5 s'expliquer en supposant qu'une partie de la protéine a été endommagée (ex : perte d'un cofacteur fortement lié) lors de son passage sur la colonne Red. Le site catalysant l'oxydation du NADH,H<sup>+</sup> ne serait pas touché. On peut aussi supposer que l'enzyme recherchée est un hétérodimère. La perte de l'activité catalytique s'expliquerait alors par la perte du monomère responsable de la production d'HGA. Dans la littérature de 10 nombreuses monooxygénases hétérodimériques à flavine ont été identifiées, ayant toutes un substrat aromatique, dans des espèces bactériennes variées (Adachi *et al.*, 1964; Arunachalam *et al.*, 1992, 1994; Prieto *et al.*, 1993; Prieto & Garcia, 1994; Arunachalam & Massey, 1994; Takizawa *et al.*, 1995; Xun, 1996 ; Xun & Sandvik, 2000). Cependant, il existe deux hypothèses pour expliquer le fonctionnement de ces 15 enzymes hétérodimériques:

- (1) Arunachalam *et al.* (1992, 1994) proposent que la 4-hydroxyphénylacétate 3-hydroxylase de *P. putida* soit constituée d'une flavoprotéine homodimérique de 65 kDa ainsi que d'une protéine de couplage de 38,5 kDa. La flavoprotéine seule est capable d'oxyder le NADH,H<sup>+</sup> indépendamment de la présence de 4-HPA. Cette oxydation du 20 NADH,H<sup>+</sup> permet de renouveler le "pool" de NAD<sup>+</sup>, mais produit de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des proportions stoechiométriques. Si la protéine de couplage est ajoutée, le complexe protéique devient capable d'hydroxyler le 4-HPA en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique. Ainsi, l'oxydation du NADH,H<sup>+</sup> n'est pas gaspillée et permet la synthèse d'un métabolite. La protéine de couplage seule n'a pas d'activité enzymatique.
- 25 (2) Prieto *et al.* (1993, 1994) et Xun & Sandvik (2000) suggèrent que la 4-HPA 3-hydroxylase de *E. coli* W (ATCC 11105) soit considérée comme un nouveau membre des monooxygénases à flavine à deux composantes mobiles (TC-FDM). Les deux composantes seraient d'une part la 4-hydroxyphénylacétate 3-hydroxylase, une enzyme monomérique de 59 kDa codée par le gène *HpaB*, et d'autre part une flavine:NADH 30 oxydoréductase monomérique de 19 kDa, codée par le gène *HpaC*. Dans ce cas, le FAD est réduit au dépend du NADH,H<sup>+</sup> par la flavine:NADH,H<sup>+</sup> oxydoréductase. Le FADH<sub>2</sub> est alors utilisé par l'oxygénase pour permettre l'oxydation du substrat en utilisant l'oxygène moléculaire.

L'enzyme que nous avons purifiée oxyde fortement le NADH<sub>2</sub>H<sup>+</sup> mais produit très peu d'homogentisate. En outre l'oxydation du NADH<sub>2</sub>H<sup>+</sup> est dépendante de l'ajout de 4-HPA. Ceci suggère que nous possédons une enzyme du type de celle décrite par Prieto et al. Nous considérons donc que l'enzyme purifiée est la 4-HPA 1-hydroxylase (HPAH) recherchée. Il est possible, que par la suite, il soit nécessaire d'identifier une protéine de couplage pour optimiser l'activité enzymatique. L'approche biochimique peut donc se poursuivre avec la protéine purifiée.

#### II.2.3- Obtention des peptides internes et de la séquence N-terminale.

La protéine purifiée est envoyée à l'Institut Pasteur pour être micro-séquencée.

10 C'est ainsi que l'on obtient la séquence N-terminale SHPAISLQAL RGSGADITQSI HIPYER et six peptides internes nommés respectivement peptides N° 11C, 12D, 20A, 22B, 23, 24 en fonction de leur ordre de sortie de colonne: ATDFITPK, LGVGQPMVDK, VVFAGDSAHG VSPFX, VTALEPQAEG AL, IDFQLGWDAD PEEEK, LSVPATLHGS ALNTPDTDTF. Sur la séquence N-terminale, on ne retrouve 15 pas l'acide aminé (méthionine ou valine) correspondant normalement au codon d'initiation du gène (ATG ou GTG). Les analyses d'homologies dans les bases protéiques en utilisant l'algorithme BLASTP ne permettent pas d'identifier de protéines homologues. Sur la base des séquences protéiques obtenues, nous faisons synthétiser les oligonucléotides dégénérés correspondants. Ceux-ci sont utilisés dans des réactions de 20 PCR afin d'identifier une partie du gène codant la protéine HPAH purifiée et partiellement séquencée.

#### II.2.4- Obtention du fragment PCR

L'amplification par PCR d'une portion (536 pb) du gène codant la 4-HPA 1-hydroxylase est obtenue en utilisant les amores dégénérées Hy4R: TCYTCNGGRT 25 CNGCRTCCCA et Hy5F: GGNGTNGGNC ARCCNATGGT qui codent respectivement les peptides 23 et 12D. Ces amores ont une température d'hybridation de 55,4°C et présentent une dégénérescence de 128 et 512 respectivement. La séquence amplifiée est clonée dans le vecteur pGEMT-easy puis elle est séquencée. L'analyse de la séquence obtenue permet de retrouver, outre les séquences codant les peptides Hy4R et Hy5F, la 30 séquence nucléique codant le peptide interne 22B. Ce dernier élément permet de confirmer que nous avons bien amplifié une partie du gène codant la protéine HPAH purifiée. A ce stade, les recherches d'homologies dans les bases protéiques, en utilisant l'algorithme BLASTX, font ressortir quelques faibles homologies avec des

hydroxylases, des oxydases et des monooxygénases. En utilisant la séquence de 536 pb amplifiée par PCR, nous allons pouvoir cribler une banque cosmidique de *P. acidovorans* afin de rechercher le cosmide contenant le gène complet.

#### **II.2.5- Criblage de la banque cosmidique de *P. acidovorans***

Le criblage de la banque cosmidique, en utilisant comme sonde la séquence obtenue ci-dessus, a permis d'identifier 4 groupes de cosmides considérés comme différents sur la base de leurs profils de restriction et d'hybridation après transfert par la technique de Southern. Les cosmides N° 1, 2, 6 forment le premier groupe, les cosmides N° 3, 7, 9 forment le second tandis que les cosmides N°5 et 8 forment le troisième . Le dernier groupe est représenté par le cosmide N°4. Les résultats d'hybridation suggèrent en outre que le gène *hpaH* recherché est présent en un seul exemplaire dans le génome de *Pseudomonas acidovorans*. Nous avons identifié des cosmides comportant au moins une partie du gène codant la protéine HPAH purifiée. Entre temps, nous avons observé que *P. putida* était incapable de croître sur 4-HPA mais pouvait croître en utilisant l'HGA comme seule source de carbone. Nous possédons donc là un excellent cible pour la complémentation fonctionnelle ; nous pourrons ainsi définir lequel de ces cosmides comporte le gène fonctionnel codant l'activité 4-HPA 1-hydroxylase.

#### **II.2.6- Complémentation fonctionnelle avec les cosmides**

Les neuf cosmides précédemment identifiés sont introduits dans *P. putida* par électroporation. Les clones obtenus sont alors repiqués sur milieu M63 contenant du 4-HPA comme seule source de carbone. Au bout de 7-8 jours seules les bactéries possédant le cosmide N°8 ont réussi à croître. C'est à dire que seul le cosmide N°8 contient toute l'information exprimable permettant la conversion du 4-HPA en HGA utilisable par *P. putida*. Le cosmide est alors dénommé Ccos8. La transformation avec l'ensemble des cosmides est répétée. C'est toujours le cosmide 8 qui permet la complémentation après un certain délai (6-10 jours). Afin de pouvoir avancer dans notre approche de détermination du fragment d'ADN minimum exprimant l'activité 4-HPA 1-hydroxylase, il nous faut sous-cloner le Ccos8. La sélection du sous-clone intéressant se fera en utilisant le cible de la complémentation fonctionnelle.

#### **II.2.7- Sous clonage par complémentation fonctionnelle**

La digestion par *Not I* du cosmide permet d'obtenir 6 fragments d'ADN de taille comprise entre 1,7 et 10 kb. Ces fragments sont clonés dans pBBR1MCS-Gm-Not-U. Cinq sous-clones de Ccos8 sont obtenus. L'analyse par restriction montre que les

fragments de 4 et 10 kb ne sont pas sous clonés. En revanche, nous observons que la bande de 5 kb observée initialement était en fait une bande double de 5,1 et 5,2 kb. Ces clones sont passés, par conjugaison tri-parentale, de *E. coli* à *P. putida*. Au bout de 5 jours, seul *P. putida* contenant le sous-clone correspondant à la bande de 5,2 kb du cosmide Ccos8 a poussé sur M63 contenant le 4-HPA comme seule source de carbone. Nous venons donc d'identifier le fragment minimal comportant l'activité 4-HPA 1-hydroxylase. Les clones correspondants à la bande de 5,2 kb sont nommés 5kbC. Pour confirmer le résultat de la complémentation fonctionnelle, nous provoquons l'élimination du plasmide p5kbC en utilisant la stratégie des origines de réPLICATION 10 incompatibles et en forçant l'élimination du plasmide p5kbC par la pression de sélection des antibiotiques utilisés. Nous observons que *P. putida* perd la capacité à croître sur 4-HPA comme seule source de carbone lorsqu'il a perdu le plasmide p5kbC. Nous en concluons que l'activité enzymatique 4-HPA 1-hydroxylase est bien portée par le plasmide p5kbC. Nous pouvons donc faire séquencer l'insert de 5,2 kb, ce qui devrait 15 nous permettre d'identifier le gène *hpaH* fonctionnel.

### II.2.8- Analyse de la séquence de 5,2 kb

L'insert de 5,2 kb du plasmide p5kbC est séquencé. Une recherche d'homologie nucléique (BLASTN) permet d'identifier ainsi trois parties dans l'insert. La première partie comprise entre les bases N° 1 et 1465 est parfaitement homologue d'une partie du 20 plasmide Birmingham IncP-alpha. Il s'agit donc vraisemblablement d'une séquence issue de pLAFR5. Une seconde partie nucléique comprise entre les bases N° 1466 et 1695 présente une homologie parfaite avec une partie du plasmide de clonage M13mp8/pUC8. Cette séquence fait donc encore partie du pLAFR-5 ; en effet le multi-site de clonage de pLAFR-5 provient de pUC8 (Keen *et al.*, 1988). Ainsi, les sites Eco 25 RI et *Sma* I (Figure 7) en position respective 1689 et 1695 sont vraisemblablement les sites de clonage du pLAFR-5. La troisième partie, comprise entre les bases 1696 et 5264 (soit 3568 pb) ne présente pas d'homologies fortes. Cette partie d'ADN provient du génome de *P. acidovorans*. Lorsque la séquence de 5,2 kb est analysée en utilisant l'algorithme BLASTX, on identifie des protéines probables (Figure 7). Ainsi la protéine 30 codée par le gène 1 présente de faibles homologies avec à des bêta-lactamases, des déhydrases et des cyclases. La protéine purifiée est codée par le gène 2 puisque l'on retrouve les séquences codant les peptides internes précédemment obtenus ; c'est donc vraisemblablement la 4-HPA 1-hydroxylase. Les alignements protéiques montrent que

cette protéine présente quelques homologies avec des oxygénases et des hydroxylases. La protéine potentiellement codée par le gène 3 ne présente pas d'homologies avec les bases de données. Enfin le gène 4 code vraisemblablement un régulateur d'opéron.

Faisons maintenant à une analyse plus fine du gène *hpaH*. D'après la séquence protéique N-terminale obtenue, le codon initiation ATG de la protéine 4-HPA 1-hydroxylase se trouve en fait 78 pb en aval d'un codon initiateur GTG en phase avec l'ATG. La séquence Shine-Dalgarno AGGA, permettant la fixation des ribosomes, est retrouvée en amont de l'ATG initiateur mais pas en amont du codon initiateur GTG ; ce qui confirme que la région codante commence au codon initiateur ATG. La portion comprise entre les codons GTG et ATG ne correspond donc vraisemblablement pas à une préprotéine. Ainsi défini, le gène *hpaH* est long de 1737 pb et se termine par le codon stop TGA. Le gène est constitué à 70,9 % de bases GC.

Maintenant que nous avons défini avec précision les limites du gène *hpaH*, analysons le produit de sa traduction : la protéine HPAH

#### II.2.9- Analyse de la protéine HPAH

La séquence *hpaH* est traduite en utilisant le système universel des codons. Nous obtenons ainsi une protéine de 563 acides aminés, ce qui représente un poids moléculaire de 62,2 kDa. Les recherches d'homologies protéique (BLASTP) montre que l'HPAH présente environ 15 à 25 % d'identité essentiellement avec des protéines d'organismes à Gram positif codant pour des activités enzymatiques apparemment très différentes de celle recherchée. Ainsi on retrouve une oxygénase de *Streptomyces argillaceus*, la 3-(3-hydroxy-phényl)propionate hydroxylase (EC 1.14.13.-) d'*E. coli*, la 2,4-dihydroxybenzoate monooxygénase de *Sphingomonas sp.*, l'enzyme catalysant la 6-hydroxylation de la tétracycline chez *Streptomyces aureofaciens*, une oxygénase potentielle de *Streptomyces fradiae*. En fait, l'HPAH présente des homologies avec les protéines de la famille des phénol monooxygénases (*pheA*) et celles de la famille des 2,4-dichlorophénol hydroxylase (*tfdB*). L'alignement correspondant aux protéines précitées est réalisé en utilisant l'algorithme ClustalW (Figure 8). Il permet de mettre en évidence des boîtes très conservées. On relèvera entre autre trois motifs d'interaction avec le FAD. Le premier (GXGXXG) correspond au motif structurel  $\beta-\alpha-\beta$  qui permet l'interaction de la partie ADP du FAD avec la protéine. Le deuxième motif (A/C)DG est impliqué dans la fixation du FAD tandis que le troisième motif G (R) VXX (A) GD (A) XH permet l'interaction avec la partie flavine du FAD. Bien que

l'enzyme utilise du NADH, H<sup>+</sup> le site de fixation correspondant (GDH) n'est pas identifié. Cette absence de site de fixation au NADH,H<sup>+</sup> est une caractéristique souvent observée chez d'autres monooxygénases à FAD. Enfin, on observe un motif (DXXXLXWKLX XXXXXXXXX LLXXXYYXER) que l'on retrouve aussi chez d'autres hydroxylases (Ferrandez *et al.*, 1997), mais dont la signification n'est pas éclaircie. Bien que la 3-(3-hydroxyphényl)-propionate hydroxylase d'*E. coli* catalyse une réaction d'hydroxylation sur un substrat structurellement proche du 4-HPA, les informations acquises par ces analyses bioinformatiques ne permettent pas de s'assurer que nous avons bien identifié la 4-HPA 1-hydroxylase. La seule manière de le faire, c'est 10 d'exprimer le gène *hpaH* et d'étudier son activité enzymatique.

### **II.2.10- Identité des protéines impliquées dans l'activité 4-HPA 1-hydroxylase**

#### **II.2.10.1- Expression du gène *hpaH* codant la 4-HPA 1-Hydroxylase**

Afin de confirmer que le gène *hpaH* code l'activité 4-HPA 1-hydroxylase, il est nécessaire d'exprimer le gène. Pour ce faire, une stratégie de clonage en deux étapes est utilisée permettant d'éliminer les gènes N° 1 et 3 et de placer le gène *hpaH* sous la dépendance du promoteur *lac* du vecteur originel pBBR1MCS-Gm-Not-U. Le plasmide obtenu est dénommé pBBR1MCS FT12Δ1. Un extrait brut est réalisé à partir d'une culture sur milieu riche de *P. putida* transformée avec ce plasmide. La recherche d'activité par spectrophotométrie (à 340 et 292 nm) montre que le clone possède certes 15 l'activité NADH,H<sup>+</sup> oxydase induite par l'ajout de 4-HPA, mais ne possède pas la capacité de synthèse de l'homogentisate à partir du 4-HPA. En revanche on observe l'apparition d'une molécule Z ayant un temps de rétention très proche (tr = 1,2 minutes *versus* 1,4 minutes) mais un spectre UV très différent de celui de l'HGA. Nous posons 20 l'hypothèse que l'HPAH oxyde le NADH,H<sup>+</sup> pour réduire son cofacteur FAD. La réoxydation du FAD se fait au détriment du 4-HPA puisque c'est l'ajout du 4-HPA qui initie la réaction. Le 4-HPA est donc convertit en métabolite Z. Le spectre UV de ce métabolite suggère que le cycle n'est plus aromatique mais peut être cependant insaturé. Nous présentons en figure 2 une hypothèse structurale pour le métabolite Z. Cette 25 expérience montre que le promoteur *lac* est fonctionnel chez *P. putida* en absence d'inducteur IPTG, ce qui suggère que le répresseur *lacI* est naturellement absent chez *P. putida*. Nous démontrons en outre que la protéine initialement purifiée (HPAH) est réellement une NADH,H<sup>+</sup> oxydase dépendante du 4-HPA qui convertit le 4-HPA en un 30 métabolite Z. La HPAH ne produit pas d'HGA. Il est donc nécessaire d'identifier la ou

les protéines partenaires de cette NADH,H<sup>+</sup> oxydase dépendante du 4-HPA et dont l'ajout permet de restaurer l'activité 4-HPA 1-hydroxylase.

#### II.2.10.2- Identification de la protéine HPAC par gel filtration

Nous avons vu que l'activité 4-HPA 1-hydroxylase disparaissait lors de la purification de l'HPAH sur colonne d'affinité Red. Nous posons donc l'hypothèse que la ou les protéines partenaires de la NADH,H<sup>+</sup> oxydase dépendante du 4-HPA n'ont pas été retenus par la résine d'affinité Red 120 agarose et sont donc récupérées dans le "flow-through". Nous décidons donc de purifier le "flow-through" et de rechercher la ou les protéines qui ajoutées à la HPAH permettent de restaurer l'activité 4-HPA 1-hydroxylase. Pour ce faire, le "flow-through" est concentrée par ultrafiltration (Macrosep™ 10K) puis chargée sur une colonne de gel filtration S75. Un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> est appliqué et les fractions de 1 mL sont collectées. On réalise alors des réactions enzymatiques mettant en présence 50 µL de chaque fraction et 10 µL d'HPAH préalablement purifié sur colonne Red , dans les conditions réactionnelles normales. Les réactions stoppées sont alors analysées par HPLC. On observe que les fractions 90 à 108, lorsque additionnées à de la protéine HPAH, permettent de produire davantage du métabolite Z. La production du métabolite Z est détectée dans ces même fractions en l'absence d'apport d'HPAH. Par ailleurs, sur les gels d'acrylamide correspondants à ces fractions, nous observons une protéine de poids moléculaire équivalent à HPAH. Nous concluons que le "flow-through" contenait encore un peu de protéine HPAH. Lorsque les fractions 109 à 143 sont additionnées à de la protéine HPAH, on observe la production d'HGA. Plus la production d'HGA est forte, plus celle du métabolite Z est faible. Le maximum de production d'homogentisate est obtenu pour les fractions 116 à 128. Le dépôt sur gel acrylamide de des fractions comprises entre 95 et 145 montre qu'une protéine est fortement enrichie dans les fractions 109 à 143, c'est à dire que le profil chromatographique de cette protéine coïncide avec le profil de production d'HGA. Nous décidons de dénommer cette protéine HPAC. La protéine HPAC est excisées du gel puis microsequencée en N-terminal. La séquence obtenue, MTTKTFA, montre que cette protéine est codée par le gène 1 (Figure 7) que nous dénommons dorénavant *hpaC*. Cette expérience montre que l'activité 4-HPA 1-hydroxylase implique deux protéines, l'HPAH et l'HPAC. Cependant, nous n'avons pas défini la nature de l'interaction entre ces deux protéines : (1) HPAH et HPAC sont elles toutes deux des enzymes ou bien (2) est-ce l'HPAH qui possède une activité enzymatique

modifiable en fonction de l'interaction avec l'HPAC.

### II.2.10.3- Nature des interactions entre HPAH et HPAC

L'expérience précédente démontre que les protéines HPAH et HPAC sont nécessaires pour reconstituer l'activité 4-HPA 1-hydroxylase. Deux hypothèses pour expliquer le rôle respectif de ces protéines sont posées. Dans ce paragraphe nous présentons les résultats qui suggèrent que l'HPAC est une enzyme à part entière. Les fractions 100, 101 et 102 de la gel filtration sont rassemblés. Elles contiennent la HPAH c'est à dire l'activité NADH<sub>H+</sub> oxydase qui permet de produire le métabolite Z à partir du 4-HPA. Par ailleurs, les fractions 123, 124 et 125 de la gel filtration sont rassemblées. Elles contiennent la HPAC. Différentes réactions enzymatiques sont réalisées en utilisant l'HPAH et/ou l'HPAC. Ces réactions sont réalisées en deux temps. Une première réaction est réalisée avec l'HPAH (respectivement HPAC), elle est stoppée au bout de 30 minutes par un traitement thermique (100°C, 10 min). On ajoute alors la HPAC (respect. HPAH) et la réaction est poursuivie pour 30 minutes. La réaction est finalement arrêtée par un ajout d'acide perchlorique. Des réactions sont aussi réalisées en remplaçant l'une des enzymes par de l'eau. Enfin, des expériences équivalentes sont réalisées en filtrant les réactions sur Nanosep™ 10 kD (Pall Filtron) au lieu de les bouillir.

Le tableau N°1 synthétise les résultats obtenus.

Expérience N°	"Enzyme" N°1	"Enzyme" N°2	Métabolite observé
	HPAH, HPAC	/	HGA
A	HPAH	H <sub>2</sub> O	métabolite Z
B	HPAH	HPAC	HGA
C	H <sub>2</sub> O	HPAC	/
D	HPAC	H <sub>2</sub> O	/
E	HPAC	HPAH	métabolite Z
F	H <sub>2</sub> O	HPAH	Métabolite Z

20

Nous observons que la seule manière de produire de l'HGA c'est d'avoir les deux protéines HPAH et HPAC simultanément ou successivement dans cet ordre. Lorsque l'HPAH est seule, ou lorsque l'HPAC est introduite avant l'HPAH, seul le métabolite Z est détectable. Enfin, la protéine HPAC n'a aucune activité enzymatique sur le 4-HPA. Ces résultats suggèrent que le métabolite Z est un intermédiaire réactionnel. L'HPAH convertirait le 4-HPA en métabolite Z, cette réaction permettant

l'oxydation du NADH<sub>2</sub>H<sup>+</sup>. Le métabolite Z serait alors convertit en HGA par la HPAC. Les interactions physiques entre les deux protéines n'apparaissent pas nécessaires puisque la protéine HPAH peut être dénaturée ou éliminée par filtration avant ajout de l'HPAC. Nous avons montré *in vitro* que l'activité 4-HPA 1-hydroxylase dépendait des 5 protéines HPAC et HPAH. Cependant la protéine HPAC n'est pas pure en sortie de gel filtration, elle est seulement enrichie. Il reste donc possible qu'en réalité se soit une autre protéine contenue dans cet extrait enrichi qui convertisse le métabolite Z en HGA. Pour éliminer les doutes, nous décidons de cloner les deux gènes (*hpaC* et *hpaH*) sur un même vecteur, nous devrions dans ce cas produire l'activité 4-HPA 1-hydroxylase et donc être capable de faire croître *P. putida* sur milieu minimum contenant du 4-HPA 10 comme seule source de carbone.

#### II.2.10.4- Complémentation fonctionnelle de *P. putida* par *hpaH* et *hpaC*

Le plasmide pL1lac2 (Figure 9) est un vecteur pBBR1MCS-Gm<sup>R</sup> contenant le gène *hpaC* sous la dépendance du promoteur de l'HPPD de *P. fluorescens* et en 15 opposition, le gène *hpaH* sous la dépendance d'un promoteur *lac*. Le plasmide est introduit dans *P. putida* par électroporation. Les bactéries sont alors étalées sur milieu minimum contenant ou non du 4-HPA comme seule source de carbone. Après 5 jours, les colonies sont visibles seulement sur boîtes contenant le 4-HPA comme seule source de carbone. Au bout de 8 jours, les colonies sont de belles tailles. L'ADN plasmidique 20 extrait à partir de ces colonies confirme la présence du plasmide pL1lac2 intègre. Par ailleurs *P. putida* est incapable de croître sur 4-HPA lorsque la bactérie est transformée avec le vecteur pBBR1MCS-GM<sup>R</sup> contenant soit le gène *hpaC* soit le gène *hpaH*. La complémentation fonctionnelle obtenue dans cette expérience confirme que les gènes *hpaC* et *hpaH* sont nécessaires et suffisants pour instaurer l'activité 4-HPA 1- 25 hydroxylase recherchée.

### Exemple III : constructions des différentes cassettes d'expression cytosolique.

#### III.1 HPAC

30 Le gène HPAC a été isolé de *Pseudomonas acidovorans* par PCR sur un plasmide dérivé (p5kbC) d'une banque cosmétique d'ADN génomique, en utilisant les oligonucléotides suivants:

Start ORF1 (AflIII): GCAGGGATGCA CATGTCCACC AAGAC

ORF1 Fin (HindIII): CGGACGCAAG CTTGCATCAG CCTTC

La réaction a été effectuée selon les conditions standards. Le fragment amplifié d'une taille de 993 pb a été sous-cloné dans le plasmide pGEMTeasy (Promega) selon le protocole du fournisseur. Le plasmide pOZ150 ainsi obtenu a été séquencé. La cassette 5 obtenue par digestion EcoRI + SpeI a été clonée dans le plasmide pBluescriptII-KS+ ouvert par les mêmes enzymes pour donner le plasmide pEPA13. Le promoteur CsVMV est isolé du plasmide pCH27, dérivé du plasmide pUC19 contenant la cassette d'expression d'un gène de tolérance herbicide sous le contrôle du CsVMV. Pour cela une PCR standard a été réalisée sur thermocycler avec la Pfu polymérase générant des 10 bouts francs; 1 cycle de 5 min à 95°C, 30 cycles [95°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 3 min. Les amores utilisées sont:

N-CsVMV: GCCCTCGAGG TCGACGGTAT TGATCAGCTT CC introduisant les sites XhoI et BclI

C-CsVMV: CGCTCTAGAA TTCAGATCTA CAAAC (EcoRI)

15 Le fragment de 565 pb généré est digéré par XhoI+EcoRI avant d'être inséré dans le plasmide pEPA13 préalablement digéré par XhoI+EcoRI; le plasmide pEPA14 est obtenu. Le terminateur Nos est isolé du plasmide pRD11, dérivé de pBlueScript II-SK(-) dans lequel est cloné le terminateur Nos, par digestion HindII+NotI. Le fragment de 292 pb obtenu est cloné dans le plasmide pEPA14 ouvert par les mêmes enzymes, 20 donnant pEPA15.

Cassette pEPA15 = promoteur CsVMV-hpa C- terminateur Nos (Figure 10 ; SEQ ID NO 19)

### III.2. HPAH

Le gène HPAH a isolé de *Pseudomonas acidovorans* par PCR sur un plasmide 25 dérivé (p5kbC) d'une banque cosmidique d'ADN génomique, en utilisant les oligonucléotides suivants:

Start ORF2 (AflIII): CAGAGGACGA ACAACATGTC CCACC

ORF2 Fin 3(HindIII): CTGTGGATGA AGCTTAAGAG GTTCAGGC

La réaction a été effectuée selon les conditions standard. Le fragment amplifié 30 d'une taille de 1729pb a été sous-cloné bouts-francs dans le plasmide pBlueScript II SK digéré par EcoRV. Le plasmide pEPA16 ainsi obtenu a été séquencé. Le promoteur CaMV 35S est isolé du plasmide pCH14, dérivé du plasmide pBI 121 contenant la cassette d'expression GUS: promoteur CaMV 35S-GUS-terminateur Nos. Pour cela une

PCR standard a été réalisée sur thermocyclé avec la Pfu polymérase générant des bouts francs; 1 cycle de 5 min à 95°C, 30 cycles [95°C 30 sec, 63°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 3 min. Les amores utilisées sont:

N-CaMV: GCATGCCCTCG AGCCCCACAGA TGG introduisant le site XhoI

5 C-CaMV: CCACCCGGGG ATCCTCTAGA G introduisant le site BamHI

Le fragment de 839 pb généré est digéré par XhoI+BamHI avant d'être inséré dans le plasmide pEPA16 préalablement digéré par XhoI + BclI; Le plasmide pEPA17 est ainsi obtenu. Le terminateur Nos est isolé du plasmide pRD11 par PCR, sous les mêmes conditions que précédemment, pour 1 cycle de 5 min à 95°C, 30 cycles [95°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 3 min., avec les amores suivantes:

N-Nos: CAAGCTTATC GATAACCGTCG ACG introduisant HindIII

C-Nos: GAATTGCGGC CGCAATTCCC GACCTAGGA ACATAG introduisant NotI et AvrII.

Le fragment de 305 pb obtenu est digéré par NotI + HindIII avant d'être cloné dans le plasmide pEPA17 ouvert par les mêmes enzymes, donnant pEPA18.

Cassette pEPA18 = promoteur CaMV 35S-hpa H- terminateur Nos (Figure 11 ; SEQ ID NO17).

### III.3. HPPO

Le gène HPPO a été isolé d'Arthrobacter globiformis par PCR sur le cosmid 2A issu d'une banque cosmidique d'ADN génomique, en utilisant les oligonucléotides suivants:

N-term-HPPO-ScaI: GAATTCAAGTA CTTCACTTAC AGTGTCCGGC introduisant les sites de restriction EcoRI et ScaI.

C-term-HPPO-AsuII-XhoI: GAATTCTCGA GTTCGAACAA ACTGAGTAGC AGCTCA introduisant les sites EcoRI, XhoI et AsuII

La réaction a été effectuée selon les conditions standard. Le fragment de 1800 pb obtenu est cloné dans le vecteur pGEMT-easy (Promega) selon le protocole du fournisseur. Le plasmide pOZ151 ainsi obtenu a été séquencé. La cassette obtenue par digestion SphI + XhoI a été clonée dans le plasmide pBBR1-MCS (Gm) ouvert par les mêmes enzymes pour donner le plasmide pEPA20. Le promoteur simple histone est isolé du plasmide pCH9, dérivé du plasmide pUC19 contenant la cassette d'expression de l'EPSPS: promoteur simple histone-intron2-OTP-EPSPS-terminateur Histone. Pour cela une PCR standard a été réalisée avec Pfu polymérase générant des bouts francs; 1

cycle de 5 min à 95°C, 5 cycles [95°C 30 sec, 45°C 30 sec, 72°C 1 min], 30 cycles [95°C 30 sec, 65°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 3 min. Les amorces utilisées sont:

N-SH: GCTTGCATGC CTAGGTGAG GAGAAATATG introduisant les sites SphI et AvrII

5 C-SH: CATGAGGGGT TCGAAATCGA TAAGC

Le fragment de 970 pb généré est digéré par SphI avant d'être inséré dans le plasmide pEPA20 préalablement digéré par SphI + ScalI; Dans le plasmide pEPA21 obtenu, l'ATG d'initiation du gène HPPO est recréé derrière le promoteur Simple Histone. Le terminateur Histone est isolé du même plasmide pCH9 par PCR, sous les 10 mêmes conditions que précédemment, pour 1 cycle de 5 min à 95°C, 35 cycles [95°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 3 min., avec les amorces suivantes:

N-Hister: CTAGACCTAG GGGATCCCC GATC introduisant AvrII

C-Hister: CCCACTAGTG TTTAAATGAT CAGTCAGGCC GAAT introduisant SpeI et BclII.

15 Le fragment de 726 pb obtenu est digéré par SpeI + AvrII avant d'être cloné dans le plasmide pEPA21 ouvert par SpeI, donnant pEPA22.

Cassette pEPA22 = promoteur simple histone-hppO-terminateur histone (Figure 12 ; SEQ ID NO 15).

#### III.4. Association des gènes

20 La cassette contenant le gène HPAC est extraite de pEPA15 par digestion NotI et clonée dans pEPA18 (NotI+Bsp120I) pour former pEPA19 (Figure 13 ; SEQ ID NO 21). Ce dernier est digéré par AvrII pour cloner la cassette extraite dans les sites AvrII+SpeI de pEPA22. Le plasmide contenant les trois constructions est pEPA23 (Figure 14 ; SEQ ID NO 22).

#### 25 III.5. Vecteur binaire

Afin de transformer les plantes par *Agrobacterium*, les trois constructions sont extractibles par BclII afin d'être introduites dans un vecteur binaire d'*Agrobactéries*.

**Abréviations :**

3,4-DHPA	acide 3,4-dihydroxyphénylacétique
4-HPA	acide 4-hydroxyphénylacétique
ADN	acide désoxyribonucléique
5 APcI	Ionisation chimique à Pression Atmosphérique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
BET	bromure d'éthidium
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
10 BSA	albumine de sérum bovin
C <sup>100</sup>	carbénicilline (100 µg/mL)
CRLD	Centre de Recherche La Dargoire
Da	Dalton
DKN	dicétonitrile de l'isoxaflutole
15 DMSO	diméthylsulfoxyde
dATP	2'désoxyadénosine 5'-triphosphate
dCTP	2'désoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	2'désoxyguanosine 5'-triphosphate
dNTP	2'-désoxynucléotides 5'-triphosphate
20 dTTP	2'désoxythymidine 5'-triphosphate
DTE	dithioéritriol
DTT	1,4-dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
FAD	flavine adénine dinucléotide
25 FPLC	" <i>fast protein liquid chromatography</i> "
Gm <sup>20</sup>	gentamycine (20µg/mL)
HGA	acide homogentisique
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HPP	acide hydroxyphénylpyruvique
30 HPPD	acide hydroxyphénylpyruvique dioxygénase
HPPO	hydroxyphénylpyruvate oxydase
IFT	isoxaflutole
IPTG	isopropyl-β-thiogalactopyranoside

	$K_n^{50}$	kanamycine (50 µg/mL)
	kb	kilo bases
	Km	constante de Michaelis-Menten
	L-DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
5	LB	milieu de Luria-Bertani
	min	minutes
	mJ	milli-joules
	MNDD	<i>manganèse dépendant dioxygénase</i>
	<i>MndD</i>	gène codant la MNDD
10	NAD <sup>+</sup> (H,H <sup>+</sup> )	nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée/forme réduite)
	OGM	Organisme génétiquement modifié
	OTP	<i>Optimised Transit Peptid</i> ; peptide de transit optimisé
	pb	paire de bases
15	pBBR1MCS-Gm	plasmide pBBR1MCS résistant à la gentamycine
	PCR	réaction de polymérisation en chaîne
	ppm	partie par million; mg.L <sup>-1</sup>
	PVDF	polyvinylène difluoride
	qsp	quantité suffisante pour
20	Q.r.	coefficient respiratoire
	Rif <sup>100</sup>	Rifampicine (100 µg/mL)
	RMN	résonance magnétique nucléaire
	SDS	dodécyle sulfate de sodium
	sec	seconde
25	TBE	tris borate EDTA
	TEV	" <i>tobacco etch virus</i> "
	TFA	acide trifluoroacétique
	TrEMBL	banque génomique EMBL traduite ( <i>translated EMBL bank</i> )
30	Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
	U.V.	ultra-violet
	vs	versus
	X-gal	5-bromo-4-chloro-3-β-D-galactopyranoside

Références

- Abe, H. ; Uchiyama, M. ; Sato, R. (1974) Isolation of phenylacetic acid and its p-hydroxyderivative as auxin-like substances from *Undaria pinnatifida*. *Agric. Biol. Chem.* 38 : 897-898
- 5 Adachi, K.; Takeda, Y.; Senoh, S.; Kita, H. (1964) Metabolism of p-hydroxyphenylacetic acid in *Pseudomonas ovalis*. *Biochem. Biophys. Acta* 93: 483-493
- Appert, C.; Logemann, E.; Hahlbrock, K.; Schmid, J.; Amrhein, N.; (1994) Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.); *Eur. J. Biochem.*; 225:491-499
- 10 Arunachalam, U.; Massey, V.; Vaidyanathan, C.S. (1992) p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 267: 25848-25855
- Arunachalam, U.; Massey, V. (1994) Studies on the oxidative half-reaction of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 269: 11795-11801
- 15 Arunachalam, U.; Massey, V.; Miller, S.M. (1994) Mechanism of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 269: 150-155
- Aubert, S. (1994) Effet multiples du glycérol sur le métabolisme de la cellule végétale non chlorophyllienne. These. Université Joseph Fourier – Grenoble - France
- Aubert, S.; Gout, E.; Bligny, R.; Marty-Mazars, D.; Barrieu, F.; Alabouvette, J; Marty, F.; Douce, R. (1996a) Ultrastructural and biochemical characterization of 20 autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J. Cell Biol.* 133: 1251-1263
- Aubert, S.; Alban, C.; Bligny, R.; Douce, R. (1996b) Induction of beta-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase in higher plant cells during carbohydrate starvation: evidence for a role of MCCase in leucine metabolism. *FEBS Lett.* 383: 175-25 180
- Aubert, S.; Bligny, R.; Douce, R. (1996c). NMR studies of metabolism in cell suspensions and tissue cultures, in " Nuclear Magnetic Resonance in Plant Physiology " (Y. Shachar-Hill and P. Pfeffer, Eds.), pp.109-154, American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA.
- 30 Aubert, S.; Bligny, R.; Day, D.A.; Whelan, J.; Douce, R. 1997. Induction of alternative oxidase synthesis by herbicides inhibiting branched-chain amino acid synthesis. *Plant J.* 11:649-657
- Aubert, S. ; Curien, G. ; Bligny, R. ; Gout, E. ; Douce, R. (1998) Transport,

- compartmentation and metabolism of homoserine in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorus-31-nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiol.* 116 : 547-557
- Aubert, S.; Pallett, K. (2000) Combined use of <sup>13</sup>C- and <sup>31</sup>P-NMR to analyse the mode of action and the metabolism of the fluoride herbicide isoxaflutole. *Plant Physiol. Biochem.*, 38 : 517-523
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1995) Current protocols in molecular biology (volume 1-4). Wiley ed., Massachusetts General Hospital & Harward Medical School.
- Bate, N.J.; Orr, J.; Ni, W.; Meromi, A.; Nadler-Hassar, T.; Doerner, P.W.; Dixon, R.A.; Lamb, C.J.; Elkind, Y. (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7608-12
- Battersby, A.R.; Chrystal, E.J.; Staunton, J. (1980) Studies of enzyme-mediated reactions. Part 12. Stereochemical course of the decarboxylation of (2S)-tyrosine to tyramine by microbial, mammalian and plant systems. *J. Chem. Soc.* 1: 31-42
- Bickel, H.; Palme, L.; Schultz, G. (1978) Incorporation of shikimate and other precursors into aromatic amino acids and prenylquinones of isolated spinach chloroplasts. *Phytochemistry*. 17: 119-124
- Bickel, H.; Buchholz, G.; Schultz, G. (1979) On the compartmentation of the biosynthesis of aromatic amino acids and prenylquinones in higher plants. In *Advances in the biochemistry and physiology of plant lipids*, Appelqvist, L.A. Liljenberg, C., eds. Elsevier, Amsterdam pp 369-375
- Biswas, I. ; Gruss, A. ; Ehrlich, S.D. ; Maguin, E. (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 175 : 3628-3635
- Blakley, E.R. (1977) The catabolism of L-tyrosine by an *Arthrobacter* sp., *Can. J. Microbiol.* 23 : 1128-1139
- Bligny, R. ; Leguay, J.J. (1987) Techniques of cell cultures. *Meth. Enzymol.* 148 : 3-16
- Boehringer Mannheim (1995) The DIG system user's guide for filter hybridization
- Boldt, Y.R.; Sadowsky, M.J.; Ellis, L.B.M.; Que, L.; Wackett, L.P. (1995) A

- Manganese-dependent Dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2 belongs to the major extradiol dioxygenase family. *J. Bacteriol.* 177: 1225-1232
- Borresen, T ; Klausen, N.K. ; Larsen, L.M. ; Sorensen, H. (1989) Purification and characterisation of tyrosine decarboxylase and aromatic-L-amino-acid decarboxylase.
- 5 *Biochem. Biophys. Acta* 993 : 108-115
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254
- Brouquisse, R.; James, F.; Pradet, A.; Raymond, P. (1992) Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. *Planta*. 188: 384-395
- Callis, J. (1995) regulation of proteine degradation. *Plant Cell.* 7 : 845-857
- 10 Campos-Garcia J., Najera R., Camarena L., Soberon-Chavez G. (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* motR gene involved in regulation of bacterial motility. *FEMS*
- 15 *Microbiol Lett.* 184: 57-62
- Chan, M.T.; Chao, Y.C.; Yu, S.M. (1994) Novel gene expression system for plant cells based on induction of alpha-amylase promoter by carbohydrate starvation. *J. Biol Chem.* 269: 17635-17641
- Chang, A.K. ; Duggleby, R.G. (1997) Expression, purification and 20 characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochem. J.* 327 : 161-169
- Chevalier, C.; Bourgeois, E.; Just, D.; Raymond, P.; (1996) Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant J.* 9: 1-11
- 25 Chua, N.H. (1980) electrophoretic analysis of chloroplast proteins. *Methods Enzymol.* 69 : 434-446
- Coligan, J.E.; Dunn, B.M.; Ploegh, H.L.; Speicher, D.W.; Wingfield, P.T. Current protocols in protein science. Wiley ed.
- Coligan, J.E. (1997) Chapter 11 : Chemical analysis in *Current Protocols in Protein Science*. Coligan, J.E. ; Dunn, B.M. ; Ploegh, H.L. ; Speicher, D.W. ; Wingfield, P.T. (eds.) Wiley. Vol. 1.
- David, C.; Daro, A.; Szalai, E.; Atarhouch, T.; Mergeay, M.(1996) Formation of polymeric pigments in the presence of bacteria and comparison with chemical oxidative

- coupling-II. Catabolism of tyrosine and hydroxyphenylacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* CH34 and mutants. *Eur. Polym. J.*, 32: 669-679
- De Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol.* 172: 6568-6572
- D'Souza LM, Willson RC, Fox GE (2000) Expression of marker RNAs in *Pseudomonas putida* *Curr Microbiol.* 40: 91-95
- Despeghel, J.P. ; Delrot, S. (1983) Energetics of amino acids uptake by *Vicia faba* leaf tissue. *Plant Physiol.* 71 : 1-6
- 10 Dey & Harborne (1997) Plant Biochemistry, page 389, Ed. P.M. Dey & J.B. Harborne, Academic Press
- Fedi S., Brazil D., Dowling D.N., O'Gara F. (1996) Construction of a modified mini-Tn5 lacZY non-antibiotic marker cassette: ecological evaluation of a lacZY marked *Pseudomonas* strain in the sugarbeet rhizosphere. *FEMS Microbiol Lett.* 135: 15 251-257
- Feretti, L. ; Sgaramella, V. (1981) Specific and reversible inhibition of the blunt end joining activity of the T4 DNA ligase. *Nucleic Acid Res.* 9 : 3695-3705
- Ferrandez, A. ; Garcia, J.L. ; Diaz, E. (1997) Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl)-propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 179 : 2573-2581
- 20 Filleur, S.; Daniel-Vedele, F. (1999) Expression analysis of a high affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* 207: 461-469
- Flodin, C.; Whitfield, F.B. (1999) 4-hydroxybenzoic acid: a likely precursor of 2,4,6-tribromophenol in *Ulva lactuca*. *Phytochemistry*. 51: 249-255
- Flügge, U.-I. (1998) Metabolite transporters in plastids. *Curr. Opinion Plant Biotech.*, 1: 201-206
- Folch, J. ; Lees, M. ; Sloane-Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509
- 30 Frommer, W.B. ; Kwart, M. ; Hirmer, B. ; Fischer, W.N. ; Hummel, S. ; Ninnemann, O. (1994) Transporters for nitrogenous compounds in plants. *Plant Mol. Biol.* 26 : 1651-1670
- Gaines, C.G.; Byng, G.S.; Whitaker, R.J.; Jensen, R.A. (1982) L-tyrosine

- regulation and biosynthesis via arogenatedehydrogenase in suspension-cultured cells of *Nicotiana silvestris* spes. et comes. *Planta*, **156**: 233-240
- Galan, B.; Diaz, E.; Prieto, M.A. (2000) Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W : a prototype of a new flavin :NAD(P)H reductase subfamily. *J. Bacteriol.* **182** : 627-636
- Garcia, I.; Rodgers, M.; Lenne, C.; Rolland, A.; Sailland, A.; Matringe, M. (1997) Subcellular localisation and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterisation of the corresponding cDNA. *Biochem. J.*; **325**: 761
- 10 Garcia, I.; Rodgers, M.; Pépin, R.; Ksieh, T.-F.; Matringe, M. (1999) Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **119** : 1507-1516
- Gazzarini, S.; Lejay, L.; Gojon, A.; Ninnemann, O.; Frommer, W.B.; von Wieren, N. (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*. **11**: 937-948
- 15 Genix, P.; Bligny, R.; Martin, J.B.; Douce, R. (1990) Transient accumulation of asparagine in sycamore cells after a long period of sucrose starvation. *Plant Physiol.* **94**: 717-722
- Georgalaki, M.D.; Sarantinopoulos, P.; Ferreira, E.S.; De Vuyst, L.; Kalantzopoulos, G.; Tsakalidou, E. (2000) Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasseri cheese. *J. Appl. Microbiol.* **88** : 817-825
- 20 Goodchild, J.A.; Givan, C.V. (1990) Influence of ammonium and external pH on the amino and organic acid content of suspension culture cells of *Acer pseudoplatanus* L. *Physiol. plant* **78**: 29-37
- Goodwin & Mercer (1988) Introduction to plant biochemistry, 2<sup>nd</sup> edition. Pergamon Press p. 356
- 25 Gout, E.; Bligny, R.; Genix, P.; Tissut, M.; Douce, R. (1992). Effect of glyphosate on plant cell metabolism. <sup>31</sup>P and <sup>13</sup>C NMR studies. *Biochimie*. **74**: 875-882
- Greenberg, D.M. ( ) Metabolic pathways. Amino acids and tetrapyrroles, 3<sup>rd</sup> edition, Academic Press, vol. III : p. 148

- Gross, D. (1975) Growth regulating substances of plant origin. *Phytochemistry*. 14 : 2105-2112
- Grunstein, M.; Hogness, D.S. (1975) Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 : 5 3961-3965
- Hahlbrock, K.; Scheel, D.; (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*; 40: 347-369
- Harelard, W.A.; Crawford, R.L.; Chapman, P.J.; Dagley, S. (1975) Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from 10 *Pseudomonas acidovorans*. *J.Bacteriol.*, 121: 272-285
- Hess, J.L. (1993) Vitamine E,  $\alpha$ -Tocophérols. In Antioxidants in Higher Plants Edited by Alscher, R.; Hess, J.; Boca Raton: CRC: p.:111-134
- Hill, C.M.; Duggleby, R.G. (1998) Mutagenesis of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase isoenzyme II and characterization of three herbicide-insensitive forms. *Biochem. J.* 335 : 653-661
- Homeyer, U.; Litek, K.; Huchzermeyer, B.; Schultz, G. (1989) Uptake of phenylalanine into isolated barley vacuoles is driven by both tonoplast adenosine triphosphatase and pyrophosphatase. *Plant Physiol.* 89: 1388-1393
- Jones, D.; Keddie, R.M. (1991) The genus *Arthrobacter*. In: The prokaryotes 20 (Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.H., eds.) 2nd eds., Springer-Verlag, New-York
- Journet E.P., Bligny R., Douce R. (1986) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* 261: 3193-3199
- Junge, K.; Gosink, J.J.; Hoppe, H.-G.; Staley, J.T. (1998) *Arthrobacter*, 25 *Brachybacterium* and *Planococcus* isolates identified from antarctic sea ice brine. Description of *Planococcus mcmekenii*, sp. nov.. *System. Appl. Microbiol.*, 21: 306-314
- Kaiser, G.; Martinoia, E.; Wiemken, A. (1982) Rapid appearance of photosynthetic products in the vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts by a new fast method. *Z. Pflanzenphysiol.* 107 : 103-113
- Keen, N.T., Tamaki, S., Kobayashi, D., Trollinger, D., (1988), Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria, *Gene*, 70, 191-197
- Kindl, H. (1969) Biosynthesis and metabolism of hydroxyphenylacetic acids in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 7: 340-347

- Koch, C.; Schumann, P.; Stackebrandt, E. (1995) Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 837-839
- Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM 2nd, Peterson KM (1994)
5. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16: 800-802
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176
- Kruk, J.; Strzalka, K. (1998) Identification of plastoquinone-C in spinach and 10 maple leaves by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochemistry* 49: 2267-2271
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-683
- Lamport, D.T.A.; Northcote, D.H. (1960) Hydroxyproline in primary cell walls of 15 higher plants. *Nature*: 188: 665-666
- Laursen, R.A. (1971) Solid-phase Edman degradation. An automatic peptide sequencer. *Eur. J. Biochem.* 20 : 89-102.
- Li, Z.-C; Bush, D.R. (1990) ΔpH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves. I. Evidence for carrier-mediated, 20 electrogenic flux through multiple transport systems. *Plant Physiol.* 94: 268-277
- Li, Z.-C; Bush, D.R. (1991) ΔpH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. II. Evidence for multiple aliphatic, neutral amino acid symports. *Plant Physiol.* 96: 1338-1344
- Liu, D.-L.; Xu, S.-X.; Wang, W.-F. (1998) a novel lignan glucoside from 25 *Forsythia suspensa* Vahl. *J. Chin. Pharmaceut. Sci.* 7: 49-51
- Löffelhardt, W. (1977) The biosynthesis of phenylacetic acids in blue-green alga *Anacyclis nidulans*: evidence for the involvement of a thylakoid-bound L-amino acid oxidase. *Z. Naturforsch.* 32: 345-350
- Luscombe, B.M.; Palett, K.E.; Loubierre, P.; Millet, J.-C.; Melgarejo, J.; Vrabel, 30 T.E. (1995) RPA 201772 a novel herbicide for broad leaf and grass weeds control in maize and sugar cane, *Proc. Brighton Crop Prot. Conf. Weeds*, 1: 35
- Luscombe, B.M.; Pallett, K.E.; (1996) Isoxaflutole for weed control in maize, *Pesticide Outlook*, December, 29

- Lutterbach, R.; Stöckigt, J. (1994) *in vivo* investigation of plant cell metabolism by means of natural-abundance  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Helv. Chim. Acta*, 77: 2153-2161
- Lutterbach, R.; Stöckigt, J.;(1995), Dynamics of the biosynthesis of 5 methylursubin in plant cells employing *in vivo*  $^{13}\text{C}$ -NMR without labelling. *Phytochemistry*, 40: 801-806
- MacLaughlin, P.J.; Weihrauch, J.L. (1979) Vitamine E content of foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 75: 647-665
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. (1982) Molecular cloning – A laboratory manual eds Cold Spring Harbor Laboratory
- Martin, M. ; Gibello, A. ; Fernandez, J. ; Ferrer, E. ; Garrido-Pertierra, A. (1991) Catabolism of 3- and 4-hydroxyphenylacetic acid by *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 132 : 621-628.
- Mayer, M.P. ; Beyer, P. ; Kleinig, H. (1990) Quinone compounds are able to replace molecular oxygen as terminal electron acceptor in phytoen desaturation in chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus* L. *Eur. J. Biochem.* 191 : 359-363
- Mayer,M.P.; Nievelstein, V.; Beyer, P. (1992) Purification and characterization of a NADPH dependent oxidoreductase from chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus*: a redox-mediator possibly involved in carotene desaturation. *Plant Physiol. Biochem.* 30: 389-398
- Mazelis, M. (1980) Amino acid metabolism. In "the biochemistry of plants" (Stumpf, PK, Conn, E.E; eds.), vol.5: amino acids and derivatives. Academic press, London, New York, pp: 1-55
- Michal, G. - ed.- (1999) Biochemical Pathways, An atlas of biochemistry and molecular biology, Wiley & Spektrum eds., p. 60
- Miflin, B.J. ; Lea, P.J. (1982) Ammonium assimilation and amino acid metabolism. In A.B. Boulter, B. Parthiers, eds, Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 14, Nucleic Acids and Proteins in Plants 1. Springer Verlag, Berlin, PP : 5-64
- Moreno-Arribas, V. ; Lonvaud-Funel, A. (1999) Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters*. 180 : 55-60
- Moreno-Arribas, V. ; Torlois, S. ; Joyeux, A. ; Bertrand, A. ; Lonvaud-Funel, A. (2000) Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria

from wine. *J. Appl. Microbiol.* **88** : 584-593

Morot-Gaudry, J.F. (1997) Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA Editions.

Mouillon, J.M.; Aubert, S.; Bourguignon, J.; Gout, E.; Douce, R.; Rebeillé, F.  
5 (1999)

Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant J.* **20**: 197-205

Murashige, T.; Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473

10 Negrel, J.; Javelle, F.;(1995); Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase or pronase elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*); *Physiologia Plantarum*, **95**: 569-574.

Nester, E.W.; Montoya, A.L. (1976) An enzyme common to histidine and aromatic amino acid biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **126**: 699-705

15 Norris, S.R.; Barette, T.R.; DellaPenna, D. (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**: 2139-2149

Pallett, K.E.; Little, J.P.; Sheekey, M.; Veerasekaran, P. (1998) The mode of action of Isoxaflutole. I. Physiological effects, metabolism and selectivity. *Pestic.*

20 *Biochem. Physiol.* **62** : 113-124

Prieto, M.A.; Perez-Randa, A.; Garcia, J.L. (1993) Characterization of an *Escherichia coli* aromatic hydroxylase with a broad substrat range. *J. Bacteriol.* **175**: 2162-2167

25 Prieto, M.A.; Garcia, J.L.; (1994) Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 22823-22829

Prieto, M.A. ; Diaz, E. ; Garcia, J.L. (1996) Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W : engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.* **178** : 111-120

30 Prieto M.A., Kellerhals M.B., Bozzato G.B., Radnovic D., Witholt B., Kessler B. (1999) Engineering of stable recombinant bacteria for production of chiral medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 3265-3271

Roberts, J.K.M. (2000) NMR adventures in the metabolic labyrinth within plants.

Trends Plant Sci. 5: 30-34

Roby, C.; Martin, J.B.; Bligny, R.; Douce, R. (1987) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. Phosphorus-31 nuclear resonance magnetic studies. *J. Biol. Chem.* 262: 5000-5007

5 Sailland, A.; Matringe, M.; Rolland, A.; Pallett, K. (1995) Gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et obtention de plantes contenant ce gène résistantes aux herbicides. WO 96/38567

Sailland, A., Deroze, R. (1999) Method for enzymatic preparation of homogentisate. WO9934008 A 19990708

10 Sambrook; Fritsch; Maniatis. Molecular cloning. A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edition  
Schroeder, C.; Sommer, J.; Humpfer, E.; Stöckigt, J. (1997) Inverse correlated <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C in vivo NMR as a probe to follow the metabolism of unlabelled vanillin by plant cell cultures. *Tetrahedron*, 53: 927-934

15 Schoenle, E.J. ; Adams, L.D. ; Sammons, D.W. (1984) Insulin-induced rapid decrease of a major protein in fat cell plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259 : 12112-12116

Shachar-Hill, Y.; Pfeffer, P.E.; Germann, M.W. (1996) Following plant metabolism in vivo and in extracts with heteronuclear two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytic. Biochem.*, 243: 110-118

20 Singer, M. ; Berg, P. (1992) Genes & Genomes. Ed. VIGOT, Paris  
Sparnins, V.L. ; Dagley, S. (1975) Alternative routes of aromatic catabolism in *Pseudomonas acidovorans* and *Pseudomonas putida* : Gallic acid as a substrate and inhibitor of dioxygenases. *J. Bacteriol.* 124 : 1374-1381

25 Stafford, H.A.; (1994) Anthocyanins and betalains : evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Sci.*; 101: 91-98

Suemori, A.; Nakajima, K.; Kurane, R.; Nakamura, Y. (1995) L-Phenylalanine and L-Tyrosine degradative pathways in *Rhodococcus erythropolis*. *Report Nat. Inst. Biosci. Hum. Tech.* 3: 33-36

30 Suemori, A.; Nakajima, K.; Kurane, R.; Nakamura, Y. (1996) Purification and characterization of o-hydroxyphenylacetate 5-hydroxylase, m-hydroxyphenylacetate 6-hydroxylase and p-hydroxyphenylacetate 1-hydroxylase from *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81: 133-137

Swiatek, L.; Grabias, B.; Kalemba, D. (1998) Phenolic acids in certain medicinal

plants of the genus *Artemisia*. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **4**: 158-160

Swiatek, L. (1977) kwasy fenolowe I Glukozydy irydoidowe w niektórych krajowych gatunkach leczniczych z rodzaju *Plantago*. *Herba Polonica* **XXIII** (3): 201-209

5 Takizawa, N.; Yokoyama, H.; Yanagihara, K.; Hatta, T.; Kiyohara, H. (1995) A locus of *Pseudomonas pickettii* DTP0602, *had*, that encodes 2,4,6-trichlorophenol 4-dechlorinase with hydroxylase activity, and hydroxylation of various chlorophenols by the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* **80**: 318-326

10 Trieu-Cuot, P. ; Carlier, C. ; Poyart-Salmeron, C. ; Courvalin, P. (1991) An integrative vector exploiting the transposition properties of Tn1545 for insertional mutagenesis and cloning of genes from Gram-positive bacteria. *Gene* **106**: 21-27

Tseng, T.C.; Tsai, T.H.; Lue, M.Y.; Lee, H.T. (1995) Identification of sucrose-regulated genes in cultured rice cells using mRNA differential display. *Gene*. **161**: 179-1782

15 Vertes, A.; Asai, Y.; Inui, M.; Kobayashi, M.; Kurusu, Y.; Yukawa, H., (1994) Transposon mutagenesis of Coryneform bacteria, *Mol. Gen. Genet.*, **245**, 397-405

Vierstra, R.D. (1993) Protein degradation in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44** : 385-410

20 Viviani, F.; Little, J.; Pallett, K.E. (1998) Mode of action of Isoxaflutole - 2-Characterisation of the inhibition of the carrot 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by the diketonitrile derivative of isoxaflutole; *Pestic. Biochem. Physiol.* **62** : 125-134

Whistance, G.R.; Threlfall, D.R. (1970) Biosynthesis of phytoquinones. Homogentisic acid: a precursor of plastoquinones, tocopherols and alpha-tocopherolquinone in higher plants, green algae and blue-green algae. *Biochem. J.* **117**: 25 593-600

Xun, L.Y. (1996) Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.* **178**: 2645-2649

30 Xun, L. & Sandvik, E.R. (2000) Characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (*HpaB*) of *Escherichia coli* as a reduced Flavin Adenine Dinucleotide-utilizing monooxygenase. *Appl. Env. Microbiol.* **66** : 481-486

**Revendications**

1. Procédé permettant de rendre les plantes tolérantes à un herbicide caractérisé en ce que l'on exprime dans lesdites plantes au moins une enzyme permettant le contournement de la voie métabolique inhibée par ledit herbicide.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'herbicide est un inhibiteur d'HPPD.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on exprime dans la plante une HPP oxydase et/ou une HPAH et/ou une HPAC.
4. Polypeptide, caractérisé en ce qu'il possède une activité HPP oxydase.
5. Polypeptide selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est insensible aux inhibiteurs d'HPPD.
6. Polypeptide selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO 2, ses fragments et ses séquences homologues.
7. Polypeptide selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides aminés sélectionnée parmi le groupe comprenant SEQ ID NO 4 et SEQ ID NO 6, leurs fragments et leurs séquences homologues
8. Polypeptide, caractérisé en ce qu'il possède une activité HPAH.
9. Polypeptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il est insensible aux inhibiteurs d'HPPD.
10. Polypeptide selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO 8, ses fragments et ses séquences homologues.
11. Polypeptide, caractérisé en ce qu'il possède une activité HPAC.
12. Polypeptide selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est insensible aux inhibiteurs d'HPPD.
13. Polypeptide selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO 10, ses fragments et ses séquences homologues.
14. Polypeptide selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides aminés sélectionnée parmi le groupe comprenant SEQ ID NO 12 et SEQ ID NO 14, leurs fragments et leurs séquences homologues

15. Séquence d'acide nucléique caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide selon l'une des revendications 4 à 14.

16. Séquence d'acide nucléique codant pour une HPP oxydase, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'acide nucléique sélectionnée parmi le groupe comprenant les séquences codantes des SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 15, leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites SEQ ID NO 1, 3, 5 ou 15.

17. Séquence d'acide nucléique codant pour une HPAH, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'acide nucléique sélectionnée parmi le groupe comprenant les séquences codantes des SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 17, leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites SEQ ID NO 7 ou 17.

18. Séquence d'acide nucléique codant pour une HPAC, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'acide nucléique sélectionnée parmi le groupe comprenant les séquences codantes des SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13 ou SEQ ID NO 19, leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites SEQ ID NO 9, 11, 13 ou 19.

19. Cassette d'expression comprenant une séquence codante, caractérisée en ce que la séquence codante comprend une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 15 à 18.

20. Vecteur de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cassette d'expression selon la revendication 19.

21. Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cassette d'expression selon la revendication 19.

22. Plante transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cassette d'expression selon la revendication 19.

23. Graines de plantes transformées selon la revendication 22, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une cassette d'expression selon la revendication 19.

24. Procédé de transformation des plantes, caractérisé en ce que l'on introduit dans leur génome au moins une cassette d'expression selon la revendication 19.

25. Procédé de désherbage sélectif de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un inhibiteur de l'HPPD, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes transformées selon la revendication 22.

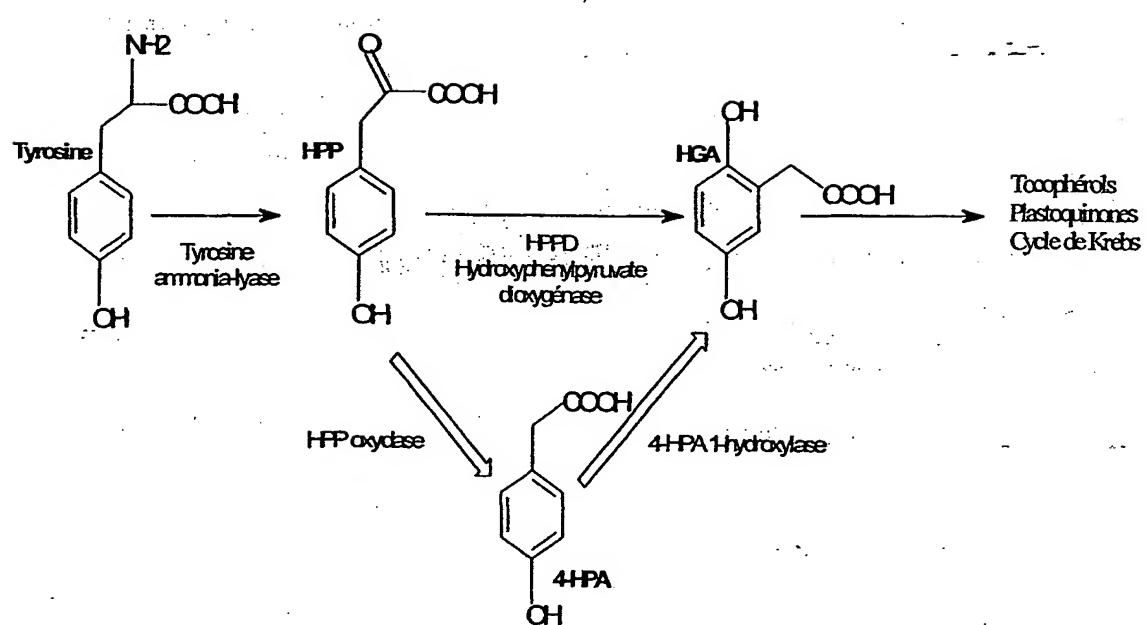
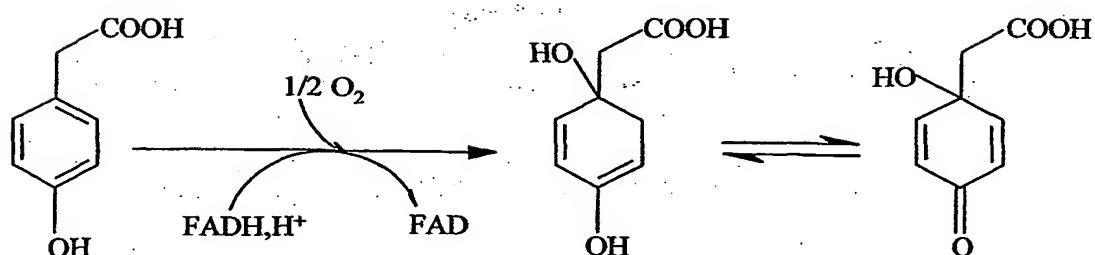
26. Procédé de contrôle des mauvaises herbes dans une surface d'un champ comprenant des graines selon la revendication 23 ou des plantes transformées selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend l'application dans la dite surface du champ d'une dose毒ique pour les dites mauvaises herbes d'un herbicide inhibiteur d'HPPD, sans toutefois affecter de manière substantielle les graines ou plantes transformée selon l'invention.

27. Procédé de culture des plantes transformées selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend le semis des graines selon la revendication 23 dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, l'application sur la dite surface du dit champ une dose毒ique pour les mauvaises herbes d'un herbicide ayant pour cible l'HPPD en cas de présence de mauvaises herbes, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis la récolte des plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement la séparation des graines des plantes récoltées.

28. Procédé selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisé en ce que l'herbicide est appliqué en pré-semis et/ou en post-levée.

25

30

**Figure 1****Figure 2**

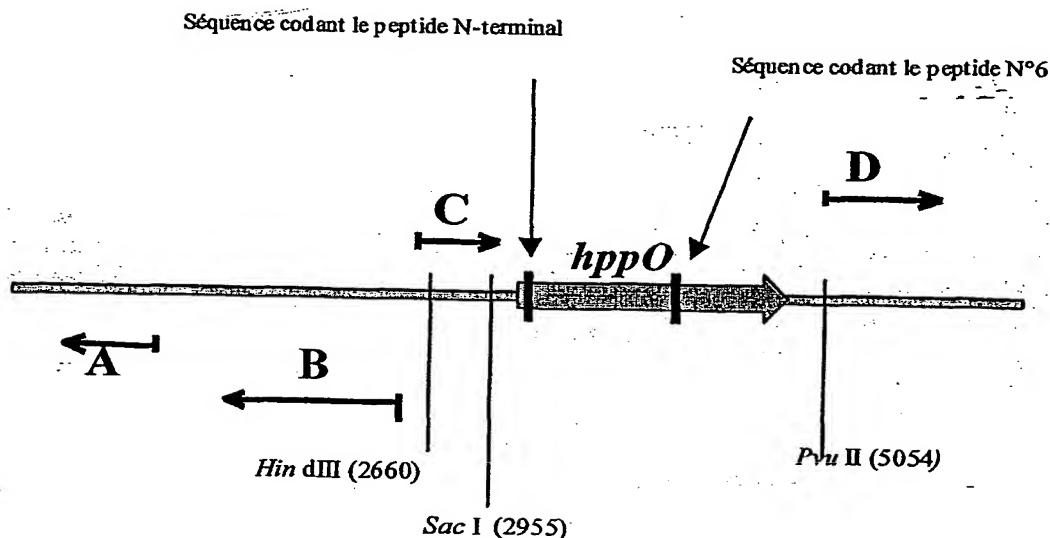


Figure 3

	SacI
2901	TTTGGAAATC GACGGGATCC AGCGGACCAAG CACTGCCATC TCCGTCTGG AAACCTTTAG CTGCCCTAGG TCGCCTGGTC GTGACGGTAG AGGCAGCAC
	SacI
2951	AGCTCATGCC GCCCGCTAT GACGGCCTGC TGGCCCGGCT GTCCCAGCAG TCGAGTACGG CGGGCGATA CTGCCGGACG ACCGGGCCGA CAGGGTCGTC
3001	GAGAGCCGCC ATCCCAGCTA GGGCATAGGT GATCCGCACC ACCTTGAGC CTCTCGGCCG TAGGGTCGAT CCCGTATCCA CTAGGCGTGG TGGAAACTCG
3051	ATATTTGCAG TAGCTACTGT GATAAACTGC CAAAAATAAC AGCTCATGTC TATAAACGTC ATCGATGACA CTATTTGACG GTTTTATGG TCGAGTACAG
+2	----- 3101 TGTTCACTTG CCAATCGCTG ATCCAGATCC GACGATTCCGCATGACTTC ACAAAGTGAAC GGTTAGCGAC TAGGTCTAGG CTGCTAAGGA CGTACTGAAG
+2	----- 3151 ACTTACAGTG TCCGGCCGGG TGGCGCAGGT CCTCAGCAGC TATGTCAGCG TGAATGTCAC AGGCCGGCCC ACCGCGTCCA GGAGTCGTCG ATACAGTCGC
	----- +2 -----> 4801 GGCAGAGGAG GCGGTGGCGG GCTAGGGCCG GCCTCGTCGA AATGCCGCC CCGCTTCCTC CGCCACCGCC CGATCCCGGC CGGAGCAGCT TTACGGCGGG
4851	TCCAACCCAA CTCAGTACCA GCTCAGGGCG TTCTCAGGGC TGGGAACGCC AGGTTGGGTT GAGTCATGGT CGAGTCCCGC AAGAGTCCCG ACCCTTGCAG

3/7

Figure 4

	51	100
HPPoxydase	(40) -GIRFTAVRHEGAIAADAYYFASGRGLAAGTTHYEPGYTNAATAAEAV	
D47069	(48) -SRIIPVRLHEANAFMIAAVGRIICKAGVALVTSGPCCSNLTGGMATAN	
G69464	(38) -GIRHITTREOGTHAHDGYAAALGKVGVAFAMSGEGATNTMIGEATAY	
YCEC1L	(51) -QFRHILARHFOGQGFTIQGMATDCAPAVCMACSGEGATNLATAADAR	
P37603	(49) DRHYIQVRLTEVGAMANAAADALIGIGVCFGAAPEGTHLYNGYDAR	
T34668	(42) -GEWVHVRLIEETNAAFAAGAEAQIICGTLTACACCGEGCNLHLINGYDAR	
	451	500
HPPoxydase	(426) RAVDDGNELLAAGCAGGFLMGCSDEESLMGAASSAVVW--YMDAAYGAEI	
D47069	(434) LVNPQRKIVSVSCDGFGLOSSMDEIAVRLHANILHGWVDNGYN-MVAI	
G69464	(419) VAFPEKTVDIAGDGGSFFMMTOPIAICMKYEIPVKVIV-LNNGYLG-MVR	
YCEC1L	(431) LANPDRKIVCFSCDGSLMMNLOEMAHASENQLDVKIVI-MNNEALG-LVH	
P37603	(434) LNYPERQIFNLAGGGASMTMQLTAQOQYHLPVINWW-FTACOYGFIKD	
T34668	(424) FTDRRRQIVSMSGDEGFTVILGFLILQHDPVKIVI-FNASSSLG-MVE	

Figure 5

## Séquence codant le peptide 23

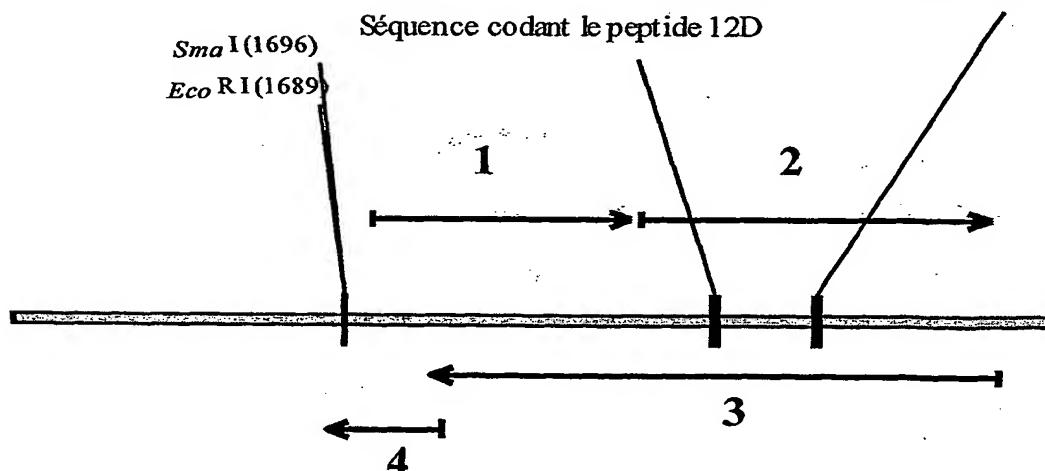


Figure 7

4/7

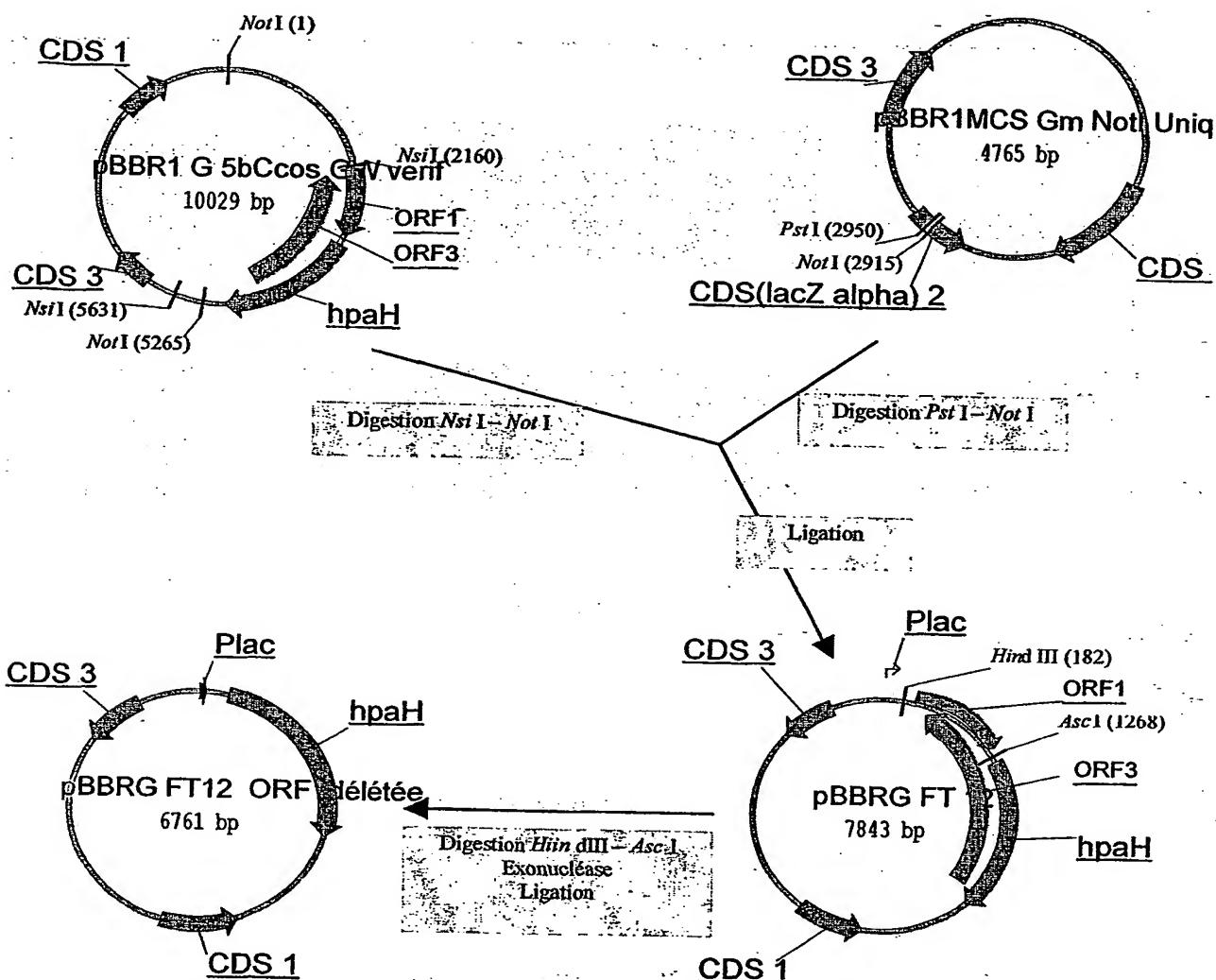


Figure 6

<b>A</b>	HPAH	(19) QSIHIPYERHADQDAGADTPARHEVIVVAGEVSLSLAIDTAQRFORVIL hydroxylase - Q53657 monoxygenase - Q9ZAM4 putativ oxygenase - Q54171 MHPA_ECOLI Oxygenase - 086481 Consensus	(51) SRPIRFRIMSI CERIGMLPCSEKKM PFGVGCHECGIMLSIDHSRRGIPSIL (1) -----MD--AS--MIAFAGCHTETMLAGEFLRLAGVDVIV (1) -----MAIQHPDIQPAVNHSVQVAPASAGVSHIMMANYAGQMIDLVV (1) -----MAD-PTR-GLVAAAEAEVETAAAEETARRSLRVRL (51) GXGXXG
<b>B</b>	HPAH	(152) ALQLPLIDILRWHSKPTALEPQAEGALLTVEET-PDGDSYR-IDAQWVHACDG hydroxylase - Q53657 monoxygenase - Q9ZAM4 putativ oxygenase - Q54171 MHPA_ECOLI Oxygenase - 086481 Consensus	(201) 250 (107) ARELG-VRIVRGSGGTGFAQDADGVTVETDT-G-----LLRARYEVGCGD (201) AEASELAVNYGWRHIDFEQGADGVSATVVEAATGKQQKIRAEYEVGAGD (107) ARELG-ADIRRGEHVTLDHDHGDHVVAEVRG-PEDEKIRLTAPYHVGCGD (127) VSRRFPNVRCFLSRENEAFSQODDEVTLHLKT-AEGQREIVKAQWVHACDG (117) VARLG-VDVEWEVETATGFSQDAEGVDVTLEH-ADGTTESTRVPWVHACDG (201) CDG
<b>C</b>	HPAH	(288) LLGKDAPFELEWASVYTFACIRLMDRFVHGTVVFGDSRNGVSPFGARGAN hydroxylase - Q53657 monoxygenase - Q9ZAM4 putativ oxygenase - Q54171 MHPA_ECOLI Oxygenase - 086481 Consensus	(351) 400 (230) SDHGMHD--VTWLSRLTDVSRSLADSYRLGRILLASDAAITHLPAGGCGLN (348) GMALDIEI-IDMTGTWAGHALVVEQMVSCTGILEGGDARHFTPAGGLYNN (244) IDISHAEH-EWVSAFGDATRLVTEYRRGAVLLGGDARHFTLPGAGGCGMN (262) PNPDNVEL--IRQRVYTHNARLAQRFRIDVLLAGDAAHIMPVWQGQGYNN (253) VRQVRTP--TWTSVFTFQQRMVPRMGEGCFVHQAATVHSPASGRGMN (351) GRVXXAGDAXH
<b>D</b>	HPAH	(338) SGVODDEENIAKAKIDPDLRQADASFAAYGARBEYAADENI---RNSTR hydroxylase - Q53657 monoxygenase - Q9ZAM4 putativ oxygenase - Q54171 MHPA_ECOLI Oxygenase - 086481 Consensus	(401) 450 (278) LGFQDQAVVAGWQIAAVRGHOTEEEDSFGGRPIADGVV---RNTRT (397) TAVEDAVNNGWQIAAHLKEQAGPEVIAASGFEPESKLAKRNTGYARGIADS (292) TGTQDQAVVNGWQIAAHLRQASSESIDDSHSEKHAVGERLM---MNTKA (310) SGMRDDEENIAKAKLIOEKARDADIDYQOERRDHAKAMI---DLSVT (300) TGVOEYVYIAGWQIAAEVHAEREIDDSLAVVPIGERLL---GSTKK (401) DXXXLXWKXXXXXXLXXXXXXX

Figure 8

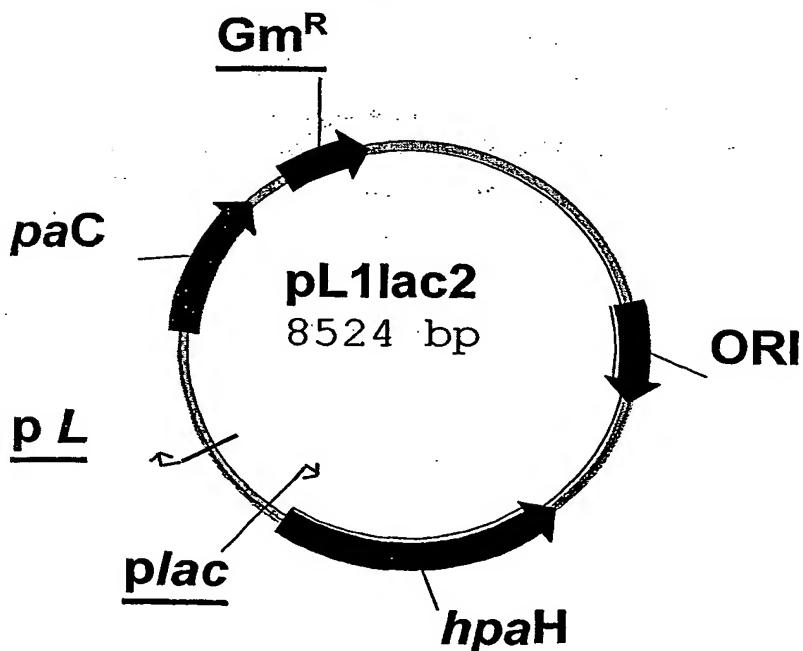
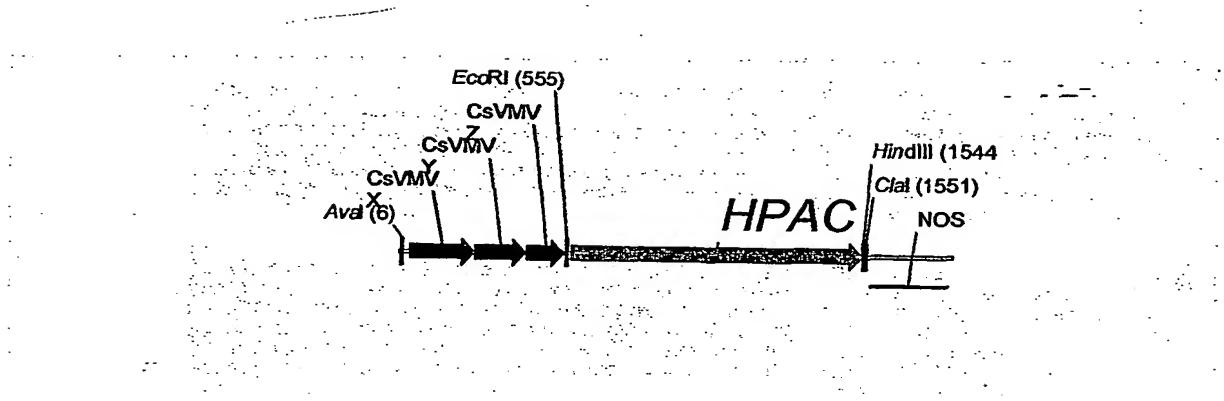
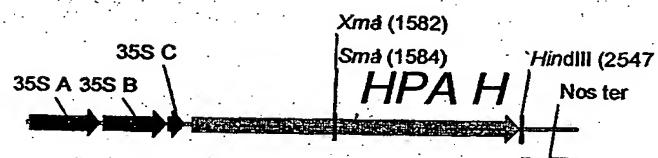
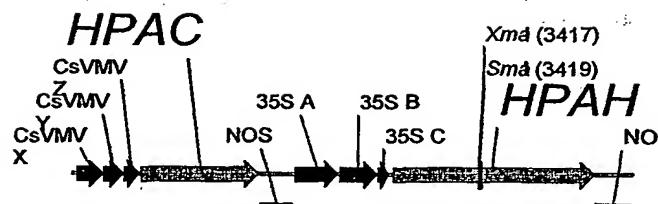
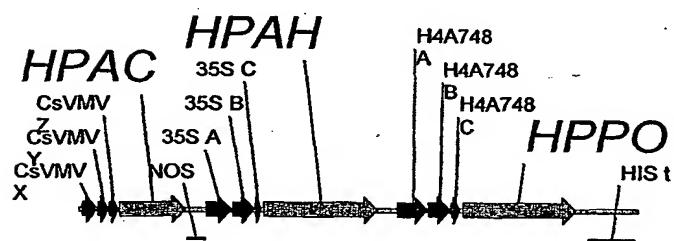


Figure 9

**Figure 10****Figure 11****Figure 12**



**Figure 13**



**Figure 14**

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; Aventis CropScience S.A.

&lt;120&gt; Plantes tolérantes aux herbicides par contournement de voie métabolique

&lt;130&gt; gènes du shunt

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 22

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1683

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arthrobacter globiformis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(1683)

&lt;400&gt; 1

atg	act	tca	ctt	aca	gtg	tcc	ggc	cg	gtg	gc	cag	gtc	ctc	agc	agc	48
Met	Thr	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Leu	Ser	Ser	
1	5								10					15		

tat	gtc	agc	gat	gtg	ttc	ggt	gtg	atg	ggc	aac	gga	aac	gtc	tac	ttc	96
Tyr	Val	Ser	Asp	Val	Phe	Gly	Val	Met	Gly	Asn	Gly	Asn	Val	Tyr	Phe	
20	25								30							

ctg	gac	gcc	gcc	gag	aag	gag	ggc	ctc	cgc	ttc	acg	gcc	gta	cgc	cat	144
Leu	Asp	Ala	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Arg	Phe	Thr	Ala	Val	Arg	His	
35	40								45							

gaa	ggt	gcc	gcc	atc	g	c	g	g	g	g	g	ac	g	c	tcc	48
Glu	Gly	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Ser	Gly	
50	55								60							

cgc	ctg	g	c	g	g	g	g	acc	acc	acc	acc	tac	ggc	ccc	ggt	ttc	ac	acc	aa	cc	192
Arg	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Asn	Ala				
65	70								75						80						

ctg	acg	gcc	ctc	g	c	g	g	g	ac	g	c	g	atc	ccc	gt	gt	ctc	288			
Leu	Thr	Ala	Leu	Ala	Glu	Ala	Val	Gln	Ala	Gln	Ile	Pro	Val	Val	Leu						
85	90								95												

gtc	acc	gg	gac	gcc	ccg	agc	agc	ggc	g	cc	c	tgg	gac	gt	gac	336				
Val	Thr	Gly	Asp	Ala	Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	Arg	Pro	Trp	Asp	Val	Asp					
100	105								110											

cag	gcc	g	c	atc	g	c	g	gg	ctg	gg	g	cc	acc	ttc	ac	gtc	acc	384			
Gln	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Thr	Phe	Thr	Val	Thr						
115	120								125												

cgt	gaa	g	cc	g	ca	gg	tcc	atc	ac	c	g	g	tg	g	ac	tt	cc	432			
Arg	Glu	Ala	Ala	Gly	Ser	Ile	Thr	Gln	Glu	Ala	Val	Glu	Tyr	Ala	Leu						
130	135								140												

gcc	cg	cg	acc	g	c	gt	atc	g	cc	gt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	480			
Ala	Arg	Arg	Thr	Ala	Val	Val	Ile	Ala	Val	Pro	Tyr	Asp	Leu	Ser	Ala						
145	150								155					160							

ctt	g	ag	g	cg	g	ag	g	aa	g	at	cc	gt	cc	cc	cc	cc	cc	528			
Leu	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Asp	Leu	Pro	Val	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Ser	Val					

165	170	175	
ccg gac gcc atc ggc ggc gga ctc gga cgg gcg gcc gaa gtg cgg gcg Pro Asp Ala Ile Gly Gly Leu Gly Arg Ala Ala Glu Val Arg Ala 180	185	190	576
gcc gaa ttg ctg gcg ggc gcg aag cgg ctc atc ctt gcc ggc cgc Ala Glu Leu Leu Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly Arg 195	200	205	624
ggt gcg cac ctc gca gga gcc ggc ccc gaa ctc cgg gaa ctc gcc gac Gly Ala His Leu Ala Gly Ala Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asp 210	215	220	672
cgc ctc ggc gcg ctc acg gcc ggc acc gca ctg gcg ctg aac ctg ctg Arg Leu Gly Ala Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu Leu 225	230	235	720
cag ggc gag ggg tac ctc ggc gtc gcg ggc ttc ggc acg gat acc Gln Gly Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp Thr 245	250	255	768
gcc gcc ggg ctc atg ggc gag gcg gac gtg gtg ctc gtg gcg gga gcc Ala Ala Gly Leu Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly Ala 260	265	270	816
agc ctg acc ccc ttc acc atg cgc ttc ggc cac ctg atc ggc ccc gac Ser Leu Thr Pro Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro Asp 275	280	285	864
gcc acc gtg atc cag atc gac acc gcc atg gag ccg acg gac ccg ccg Ala Thr Val Ile Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro Arg 290	295	300	912
gtg gac ctg ttt gtc agt gcg gac gcg aag gcc gct gcc ggc cgg atc Val Asp Leu Phe Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Gly Arg Ile 305	310	315	960
ctc cgg ctg ctg gat gac gcc gcc ggg gcc aat gcg tcg aag gcc tgg Leu Arg Leu Leu Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala Trp 325	330	335	1008
cgc gcg gaa gca ctc aag cgt ctg gcc gaa gga ccc tgc cac cac ccc Arg Ala Glu Ala Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His Pro 340	345	350	1056
gcc acc gca gag acc acg gac ggc cgc ctt gac ccc cgg gcg ctt gct Gly Thr Ala Glu Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu Ala 355	360	365	1104
tcg gca ctg gat gcc gtc ctg ccc gaa cgc cgc acc gtg gtc cag gac Ser Ala Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp 370	375	380	1152
ggc ggg cac ttc ctg ggc tgg gca ccc atg tac tgg cgc atc ccc cgt Gly Gly His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg 385	390	395	1200
cct cag gac ctg gtc atg gtg ggg acc gcg tac cag tcg atc ggg ctt Pro Gln Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu 405	410	415	1248
ggc ctg gcc agc gcc gtg ggg gcg tcc cgg gcc gtg gac gac ggc aat Gly Leu Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn 420	425	430	1296
atc ctg gtg ctg gcg gcg ggc gac ggc gga ttc ctg atg ggc ctg tcc Ile Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser			1344

435

440

445

gac ctg gaa tcg ctc gtg ggc gcg gcg agc agc gcc gtc gtg gtg atc 1392  
 Asp Leu Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile  
 450 455 460

tac aac gac gcc gcc tac ggg gcc gag atc cat cag tac ggc tca cgg 1440  
 Tyr Asn Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg  
 465 470 475 480

ggg ctc acc gaa aag ccc atg ctg atc ccc gaa gtg gac ttc agc ggg 1488  
 Gly Leu Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly  
 485 490 495

att gcc ccg gcg atc ggg gcg gaa tcc gca atc atc cgc aag ctg tcg 1536  
 Ile Ala Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser  
 500 505 510

gac ctc tcc gcg ctc acg gac tgg atc gag gcc ggc gcc agg gga acc 1584  
 Asp Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr  
 515 520 525

ttc gtg gcc gac tgc cgc atc acc tca agc gtc cgg gcc ccg tgg ctg 1632  
 Phe Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu  
 530 535 540

agc gaa tgg atg agg gcc tcg caa gcg gcg aag gag gcg gtg gcg ggc 1680  
 Ser Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly  
 545 550 555 560

tag 1683

<210> 2  
 <211> 561

<212>  
 <213> Arthrobacter globiformis

<400> 2

Met Thr Ser Leu Thr Val Ser Gly Arg Val Ala Gln Val Leu Ser Ser  
 1 5 10 15

Tyr Val Ser Asp Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr Phe  
 20 25 30

Leu Asp Ala Ala Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg His  
 35 40 45

Glu Gly Ala Ala Ile Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly  
 50 55 60

Arg Leu Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn Ala  
 65 70 75 80

Leu Thr Ala Leu Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val Leu  
 85 90 95

Val Thr Gly Asp Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val Asp  
 100 105 110

Gln Ala Ala Ile Ala Ala Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val Thr  
 115 120 125

Arg Glu Ala Ala Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala Leu  
 130 135 140

Ala Arg Arg Thr Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser Ala

145	150	155	160
Leu Glu Ala Ala Glu Glu Asp Leu Pro Val Pro Pro Ala Ala Ser Val			
165	170	175	
Pro Asp Ala Ile Gly Gly Leu Gly Arg Ala Ala Glu Val Arg Ala			
180	185	190	
Ala Glu Leu Leu Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly Arg			
195	200	205	
Gly Ala His Leu Ala Gly Ala Gly Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asp			
210	215	220	
Arg Leu Gly Ala Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu Leu			
225	230	235	240
Gln Gly Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp Thr			
245	250	255	
Ala Ala Gly Leu Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly Ala			
260	265	270	
Ser Leu Thr Pro Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro Asp			
275	280	285	
Ala Thr Val Ile Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro Arg			
290	295	300	
Val Asp Leu Phe Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ile			
305	310	315	320
Leu Arg Leu Leu Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala Trp			
325	330	335	
Arg Ala Glu Ala Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His Pro			
340	345	350	
Gly Thr Ala Glu Thr Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu Ala			
355	360	365	
Ser Ala Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp			
370	375	380	
Gly Gly His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg			
385	390	395	400
Pro Gln Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu			
405	410	415	
Gly Leu Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn			
420	425	430	
Ile Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser			
435	440	445	
Asp Leu Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile			
450	455	460	
Tyr Asn Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg			
465	470	475	480
Gly Leu Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly			
485	490	495	
Ile Ala Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser			
500	505	510	

Asp Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr  
 515 520 525

Phe Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu  
 530 535 540

Ser Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala  
 545 550 555 560

Gly

<210> 3

<211> 1944

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant  
 d'HPPO d'A. globiformis

<220>

<221> CDS

<222> (55)..(1737)

<400> 3

ccgacgtcgc atgctcccg ccgccatggc ggccgcggga attcgattga attc atg 57  
 Met 1

act tca ctt aca gtg tcc ggc cggttgc gtc ctc agc agc tat 105  
 Thr Ser Leu Thr Val Ser Gly Arg Val Ala Gln Val Leu Ser Ser Tyr  
 5 10 15

gtc agc gat gtg ttc ggt gtg atg ggc aac gga aac gtc tac ttc ctg 153  
 Val Ser Asp Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr Phe Leu  
 20 25 30

gac gcc gcc gag aag gag ggc ctc cgc ttc acg gcc gta cgc cat gaa 201  
 Asp Ala Ala Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg His Glu  
 35 40 45

ggt gcc gcc atc gcg gcg gac gcc tac tat cgg gca tcc ggg cgc 249  
 Gly Ala Ala Ile Ala Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly Arg  
 50 55 60 65

ctg gcg ggg acc acc acc tac ggc ccc ggt tac acc aac gcc ctg 297  
 Leu Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn Ala Leu  
 70 75 80

acg gcc ctc gcc gag gcg gtc cag gcg cag atc ccc gtc gtc ctc gtc 345  
 Thr Ala Leu Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val Leu Val  
 85 90 95

acc ggg gac gcc ccg agc agc ggc gcc cgg cct tgg gac gtc gac cag 393  
 Thr Gly Asp Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val Asp Gln  
 100 105 110

gcc gcg atc gcc ggc ggg ctg ggg gcg acc ttc acg gtc acc cgt 441  
 Ala Ala Ile Ala Ala Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val Thr Arg  
 115 120 125

gaa gcc gca ggc tcc atc acg cag gaa gcg gtc gag tac gca ctt gcc 489  
 Glu Ala Ala Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala Leu Ala  
 130 135 140 145

cgg cgg acc gcc gtc gtc atc gcc gtt cca tac gac cgt tcg gcc ctt 537  
 Arg Arg Thr Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser Ala Leu

150	155	160	
gag gcg gcg gag gaa gat ctt ccc gtg ccg ccg gcg gcc tcg gtt ccg Glu Ala Ala Glu Glu Asp Leu Pro Val Pro Pro Ala Ala Ser Val Pro 165 170 175 585			
gac gcc atc ggc ggc gga ctc gga cgg gcg gcc gaa gtg cgg gcg gcc Asp Ala Ile Gly Gly Leu Gly Arg Ala Ala Glu Val Arg Ala Ala 180 185 190 633			
gaa ttg ctg gcg ggc gcg aag cgg ccg ctc atc ctt gcc ggc cgc ggt Glu Leu Leu Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly Arg Gly 195 200 205 681			
gcg cac ctc gca gga acc ggc ccc gaa ctc cgg gaa ctc gcc gac cgc Ala His Leu Ala Gly Thr Gly Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asp Arg 210 215 220 225 729			
ctc ggc gcg ctc acg gcc acc gca ctg gcg ctg aac ctg ctg cag Leu Gly Ala Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu Leu Gln 230 235 240 777			
ggc gag ggg tac ctc ggc gtc gcg ggc ttc ggc acg gat acc gcc Gly Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp Thr Ala 245 250 255 825			
gcc ggg ctc atg ggc gag gcg gac gtg gtg ctc gtg gcg gga gcc agc Ala Gly Leu Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly Ala Ser 260 265 270 873			
ctg acc ccc ttc acc atg cgc ttc ggc cac ctg atc ggc ccg gac gcc Leu Thr Pro Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro Asp Ala 275 280 285 921			
acc gtg atc cag atc gac acc gcc atg gag ccg acg gac ccg cgg gtg Thr Val Ile Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro Arg Val 290 295 300 305 969			
gac ctg ttt gtc agt gcg gac gcg aag gcc gct gcc ggc cgg atc ctc Asp Leu Phe Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Gly Arg Ile Leu 310 315 320 1017			
cgg ctg ctg gat gac gcc gcc ggg gcc aat gcg tcg aag gcc tgg cgc Arg Leu Leu Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala Trp Arg 325 330 335 1065			
gcg gaa gca ctc aag cgt ctg gcc gaa gga ccc tgc cac cac ccc ggc Ala Glu Ala Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His Pro Gly 340 345 350 1113			
acc gca gag acc acg gac ggc cgc ctt gac ccc cgg gcg ctt gct tcg Thr Ala Glu Thr Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu Ala Ser 355 360 365 1161			
gca ctg gat gcc gtc ctg ccg gaa cgc cgc acc gtg gtc cag gac ggc Ala Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp Gly 370 375 380 385 1209			
ggg cac ttc ctg ggc tgg gca ccc atg tac tgg cgc atc ccc cgt cct Gly His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg Pro 390 395 400 1257			
cag gac ctg gtc atg gtg ggg acc gcg tac cag tcg atc ggg ctt ggc Gln Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu Gly 405 410 415 1305			
ctg gcc agc gcc gtg ggg gcg tcc cgg gcc gtg gac gac ggc aat atc Leu Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn Ile 1353			

420	425	430	
ctg gtg ctg gcg ggc gac ggc gga ttc ctg atg ggc ctg tcc gac Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser Asp 435 440 445			1401
ctg gaa tcg ctc gtg ggc gcg gcg agc agc gcc gtc gtg gtg atc tac Leu Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile Tyr 450 455 460 465			1449
aac gac gcc gcc tac ggg gcc gag atc cat cag tac ggc tca cgg ggg Asn Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg Gly 470 475 480			1497
ctc acc gaa aag ccc atg ctg atc ccc gaa gtg gac ttc aac ggg att Leu Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly Ile 485 490 495			1545
gcc cgc gcg atc ggg gcg gaa tcc gca atc atc cgc aag ctg tcg gac Ala Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser Asp 500 505 510			1593
ctc tcc gcg ctc acg gac tgg atc gag gcc ggc gac agg gga acc ttc Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr Phe 515 520 525			1641
gtg gcc gac tgc cgc atc acc tca agc gtc cgg gcc ccg tgg ctg agc Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu Ser 530 535 540 545			1689
gaa tgg atg agg gcc tcg caa gcg gcg aag gag gcg gtg gcg ggc tag Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly 550 555 560			1737
ggccggcctc gtcgaaatgc cgccctccaa cccaaactcag taccagctca gggcgttctc 1797 aggctggga acgcccctgag ctgctactca ttgttcgaa ctcgagaatt caatcaactag 1857 tgaattcgcg gccgcctgca ggtcgaccat atgggagagc tcccaacgcg ttggatgcat 1917 agcttgagta ttctatagtg tcaccta			1944
<p>&lt;210&gt; 4  &lt;211&gt; 561  &lt;212&gt;  &lt;213&gt; Séquence artificielle  &lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: mutant  d'HPPO d'A. globiformis</p>			
<p>&lt;400&gt; 4  Met Thr Ser Leu Thr Val Ser Gly Arg Val Ala Gln Val Leu Ser Ser  1 5 10 15</p>			
<p>Tyr Val Ser Asp Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr Phe  20 25 30</p>			
<p>Leu Asp Ala Ala Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg His  35 40 45</p>			
<p>Glu Gly Ala Ala Ile Ala Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly  50 55 60</p>			
<p>Arg Leu Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn Ala  65 70 75 80</p>			
<p>Leu Thr Ala Leu Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val Leu  85 90 95</p>			

Val Thr Gly Asp Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val Asp  
 100 105 110  
 Gln Ala Ala Ile Ala Ala Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val Thr  
 115 120 125  
 Arg Glu Ala Ala Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala Leu  
 130 135 140  
 Ala Arg Arg Thr Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Ala Ala Glu Glu Asp Leu Pro Val Pro Pro Ala Ala Ser Val  
 165 170 175  
 Pro Asp Ala Ile Gly Gly Leu Gly Arg Ala Ala Glu Val Arg Ala  
 180 185 190  
 Ala Glu Leu Leu Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly Arg  
 195 200 205  
 Gly Ala His Leu Ala Gly Thr Gly Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asp  
 210 215 220  
 Arg Leu Gly Ala Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Gln Gly Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp Thr  
 245 250 255  
 Ala Ala Gly Leu Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly Ala  
 260 265 270  
 Ser Leu Thr Pro Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro Asp  
 275 280 285  
 Ala Thr Val Ile Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro Arg  
 290 295 300  
 Val Asp Leu Phe Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ile  
 305 310 315 320  
 Leu Arg Leu Leu Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala Trp  
 325 330 335  
 Arg Ala Glu Ala Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His Pro  
 340 345 350  
 Gly Thr Ala Glu Thr Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu Ala  
 355 360 365  
 Ser Ala Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp  
 370 375 380  
 Gly Gly His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg  
 385 390 395 400  
 Pro Gln Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu  
 405 410 415  
 Gly Leu Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn  
 420 425 430  
 Ile Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser  
 435 440 445  
 Asp Leu Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile

450	455	460
Tyr Asn Asp Ala Ala	Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg	
465	470	475
Gly Leu Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly		480
485	490	495
Ile Ala Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser		
500	505	510
Asp Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr		
515	520	525
Phe Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu		
530	535	540
Ser Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly		
545	550	555
		560

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1962

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: mutant  
d'HPPO d'A. globiformis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (111)..(1793)

&lt;400&gt; 5

aggtgacact atagaatact caagctatgc atccaaacgcg ttgggagctc tcccatatgg 60

tcgacctgca ggccggcccg aattcaactag tgatttgaag gatccgggtgc atg act 116  
Met Thr  
1tca ctt aca gtg tcc ggc cgg gtg gcg cag gtc ctc agc agc tat gtc 164  
Ser Leu Thr Val Ser Gly Arg Val Ala Gln Val Leu Ser Ser Tyr Val  
5 10 15agc gat gtg ttc ggt gtg atg ggc aac gga aac gtc tac ttc ctg gac 212  
Ser Asp Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr Phe Leu Asp  
20 25 30gcc gcc gag aag gag ggc ctc cgc ttc acg gcc gta cgc cat gaa ggt 260  
Ala Ala Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg His Glu Gly  
35 40 45 50gcc gcc atc gcg gcg gac gcc tac tat cgg gca tcc ggg cgc ctg 308  
Ala Ala Ile Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly Arg Leu  
55 60 65gcg gcg ggg acc acc acc tac ggc ccc ggt tac acc aac gcc ctg acg 356  
Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn Ala Leu Thr  
70 75 80gcc ctc gcc gag gcg gtc cag gcg cag atc ccc gtc gtc gtc acc 404  
Ala Leu Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val Leu Val Thr  
85 90 95

ggg gac gcc ccg agc agc ggc gcc cgg cct tgg gac gtc gac cag gcc 452

Gly Asp Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val Asp Gln Ala			
100	105	110	
gct atc gcc ggc ggg ctg ggg gct ggc acc ttc acg gtc acc cgt gaa			500
Ala Ile Ala Gly Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val Thr Arg Glu			
115	120	125	130
gcc gca ggc tcc atc acg cag gaa gct gtg gag tac gca ctt gcc cgg			548
Ala Ala Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala Leu Ala Arg			
135	140	145	
cgg acc gcc gtc gtg atc gcc gtt cca tac gac ctg tcg gcc ctt gag			596
Arg Thr Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser Ala Leu Glu			
150	155	160	
gct gca gag gaa gat ctt ccc gtg cct gct ggg gct tcg gtt ccg gac			644
Ala Ala Glu Glu Asp Leu Pro Val Pro Ala Ala Ser Val Pro Asp			
165	170	175	
gcc atc ggc ggc gga ctc gga cgg gct gaa gtg cgg gct gac gaa			692
Ala Ile Gly Gly Leu Gly Arg Ala Ala Glu Val Arg Ala Ala Glu			
180	185	190	
ttt ctg gct ggc ggg aag cgg cct atc ctt gcc ggc cgc ggt gct			740
Leu Leu Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly Arg Gly Ala			
195	200	205	210
cac ctc gca gga gcc ggc ccc gaa ctc cgg gaa ctc gcc gac cgc ctc			788
His Leu Ala Gly Ala Gly Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asp Arg Leu			
215	220	225	
ggc gct ctc acg gcc ggc acc gca ctg gct aac ctg ctg cag ggc			836
Gly Ala Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu Leu Gln Gly			
230	235	240	
gag ggg tac ctc ggc gtc gct ggc ggc ttc ggc acg gat acc gcc gcc			884
Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp Thr Ala Ala			
245	250	255	
ggg ctc atg ggc gag gct gtc gtg ctc gtg gct gga gcc agc ctg			932
Gly Leu Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly Ala Ser Leu			
260	265	270	
acc ccc ttc acc atg cgc ttc ggc cac ctg atc ggc ccc gac gcc acc			980
Thr Pro Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro Asp Ala Thr			
275	280	285	290
gtg atc cag atc gac acc gcc atg gag ccc acg gac ccc cgg gtg gac			1028
Val Ile Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro Arg Val Asp			
295	300	305	
ctg ttt gtc agt gct gac ggc aag gcc gct gcc ggc cgg atc ctc cgg			1076
Leu Phe Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ile Leu Arg			
310	315	320	
ctg ctg gat gac gcc ggg gcc aat gct gtc aag gcc tgg cgc gct			1124
Leu Leu Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala Trp Arg Ala			
325	330	335	
gaa gca ctc aag cgt ctg gcc gaa gga ccc tgc cac cac ccc ggc acc			1172
Glu Ala Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His Pro Gly Thr			
340	345	350	
gca gag acc acg gac ggc cgc ctt gac ccc cgg gct ctt gct tcg gca			1220
Ala Glu Thr Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu Ala Ser Ala			
355	360	365	370
ctg gat gcc gtc ctg ccc gaa cgc cgc acc gtc gac cag gac ggc ggg			1268

Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp Gly Gly  
 375 380 385  
 cac ttc ctg ggc tgg gca ccc atg tac tgg cgc atc ccc cgt cct cag 1316  
 His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg Pro Gln  
 390 395 400  
 gac ctg gtc atg gtg ggg acc gcg tac cag tcg atc ggg ctt ggc ctg 1364  
 Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu Gly Leu  
 405 410 415  
 gcc agc gcc gtg ggg gcg tcc cgg gcc gtg gac gac ggc aat atc ctg 1412  
 Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn Ile Leu  
 420 425 430  
 gtg ctg gcg ggc gac ggc gga ttc ctg atg ggc ctg tcc gac ctg 1460  
 Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser Asp Leu  
 435 440 445 450  
 gaa tcg ctc gtg ggc gcg gcg agc agc gac gtc gtg gtg atc tac aac 1508  
 Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile Tyr Asn  
 455 460 465  
 gat gcc gcc tac ggg gcc gag atc cat cag tac ggc tca cgg ggg ctc 1556  
 Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg Gly Leu  
 470 475 480  
 acc gaa aag ccc atg ctg atc ccc gaa gtg gac ttc agc ggg att gcc 1604  
 Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly Ile Ala  
 485 490 495  
 cgc gcg atc ggg gcg gaa tcc gca atc atc cgc aag ctg tcg gac ctc 1652  
 Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser Asp Leu  
 500 505 510  
 tcc gcg ctc acg gac tgg atc gag gcc ggc gcc agg gga acc ttc gtg 1700  
 Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr Phe Val  
 515 520 525 530  
 gcc gac tgc cgc atc acc tca agc gtc cgg gcc ccg tgg ctg agc gaa 1748  
 Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu Ser Glu  
 535 540 545  
 tgg atg agg gcc tcg caa gcg gcg aag gag ggc gtg gcg ggc tag 1793  
 Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly  
 550 555 560  
 ggccggcctc gtcgaaatgc cgccctccaa cccaaactca taccagctca gggcggttctc 1853  
 agggctggga acgcctgag ctgctactca gtttgttcga actcgagaat tcaatcgaat 1913  
 tcccgccggcc gccatggcgg ccgggagcat gcgacgtcgg gcccattcg 1962  
  
 <210> 6  
 <211> 541  
 <212>  
 <213> Séquence artificielle  
 <223> Description de la séquence artificielle: mutant  
 d'HPPO d'A. globiformis  
  
 <400> 6  
 Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr Phe Leu Asp Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg His Glu Gly Ala Ala  
 20 25 30

Ile Ala Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly Arg Leu Ala Ala  
 35                   40                   45

Gly Thr Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn Ala Leu Thr Ala Leu  
 50                   55                   60

Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val Leu Val Thr Gly Asp  
 65                   70                   75                   80

Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val Asp Gln Ala Ala Ile  
 85                   90                   95

Ala Gly Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val Thr Arg Glu Ala Ala  
 100                  105                  110

Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala Leu Ala Arg Arg Thr  
 115                  120                  125

Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser Ala Leu Glu Ala Ala  
 130                  135                  140

Glu Glu Asp Leu Pro Val Pro Pro Ala Ala Ser Val Pro Asp Ala Ile  
 145                  150                  155                  160

Gly Gly Gly Leu Gly Arg Ala Ala Glu Val Arg Ala Ala Glu Leu Leu  
 165                  170                  175

Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly Arg Gly Ala His Leu  
 180                  185                  190

Ala Gly Ala Gly Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asp Arg Leu Gly Ala  
 195                  200                  205

Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu Leu Gln Gly Glu Gly  
 210                  215                  220

Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp Thr Ala Ala Gly Leu  
 225                  230                  235                  240

Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly Ala Ser Leu Thr Pro  
 245                  250                  255

Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro Asp Ala Thr Val Ile  
 260                  265                  270

Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro Arg Val Asp Leu Phe  
 275                  280                  285

Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ile Leu Arg Leu Leu  
 290                  295                  300

Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala Trp Arg Ala Glu Ala  
 305                  310                  315                  320

Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His Pro Gly Thr Ala Glu  
 325                  330                  335

Thr Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu Ala Ser Ala Leu Asp  
 340                  345                  350

Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp Gly Gly His Phe  
 355                  360                  365

Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg Pro Gln Asp Leu  
 370                  375                  380

Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu Gly Leu Ala Ser  
 385                  390                  395                  400

Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn Ile Leu Val Leu  
 405 410 415  
 Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser Asp Leu Glu Ser  
 420 425 430  
 Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile Tyr Asn Asp Ala  
 435 440 445  
 Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg Gly Leu Thr Glu  
 450 455 460  
 Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly Ile Ala Arg Ala  
 465 470 475 480  
 Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser Asp Leu Ser Ala  
 485 490 495  
 Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr Phe Val Ala Asp  
 500 505 510  
 Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu Ser Glu Trp Met  
 515 520 525  
 Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly  
 530 535 540

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1692

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Pseudomonas acidovorans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(1692)

&lt;400&gt; 7

atg tcc cac ccc gcc atc tcc ctg caa gcg ctg cgc ggc agc ggc gca 48  
 Met Ser His Pro Ala Ile Ser Leu Gln Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala  
 1 5 10 15

gac ata cag tcc atc cac atc ccc tac gag cgc cat gcc gac cag gac 96  
 Asp Ile Gln Ser Ile His Ile Pro Tyr Glu Arg His Ala Asp Gln Asp  
 20 25 30

gcc ggt gcg gac acg ccc gcc cggt cat ccc gtc gtc atc gtc ggc gcc 144  
 Ala Gly Ala Asp Thr Pro Ala Arg His Pro Val Val Ile Val Gly Ala  
 35 40 45

ggc ccc gtg ggc ctg tgg gac atc gac ctg gcc cag cgc ggc cag 192  
 Gly Pro Val Gly Leu Ser Leu Ala Ile Asp Leu Ala Gln Arg Gly Gln  
 50 55 60

cgc gtg gtg ctg ctg gac aac gac tgc cgg ctg tcc acg ggc tgg cgc 240  
 Arg Val Val Leu Leu Asp Asn Asp Cys Arg Leu Ser Thr Gly Ser Arg  
 65 70 75 80

gcc atc tgc ttt tcc aag cgc acg ctg gag atc tgg gac cgc ctg ggc 288  
 Ala Ile Cys Phe Ser Lys Arg Thr Leu Glu Ile Trp Asp Arg Leu Gly  
 85 90 95

gtg ggc cag ccc atg gtg gac aag ggc gtg tcc tgg aac ctg ggc aag 336  
 Val Gly Gln Pro Met Val Asp Lys Gly Val Ser Trp Asn Leu Gly Lys  
 100 105 110

gtc ttc ttc aag gac cag cag ctg tac cgc ttc gac ctg ctg ccc gag 384

Val Phe Phe Lys Asp Gln Pro Leu Tyr Arg Phe Asp Leu Leu Pro Glu			
115	120	125	
gac ggc cac gag cgc ccg gcc ttc atc aac ctg cag cag tac tac gcc			432
Asp Gly His Glu Arg Pro Ala Phe Ile Asn Leu Gln Gln Tyr Tyr Ala			
130	135	140	
gag gcc tat ctg gtc gag cgc gca ctg cag ctg ccg ctg atc gac ctg			480
Glu Ala Tyr Leu Val Glu Arg Ala Leu Gln Leu Pro Leu Ile Asp Leu			
145	150	155	160
cgc tgg cac agc aag gtc acg gca ctg gag ccg cag gcc gag ggc gcg			528
Arg Trp His Ser Lys Val Thr Ala Leu Glu Pro Gln Ala Glu Gly Ala			
165	170	175	
ctg ctg acc gtg gag acg cct gac ggc agc tac cgc atc gat gcg caa			576
Leu Leu Thr Val Glu Thr Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ile Asp Ala Gln			
180	185	190	
tgg gtc ctg gcc tgc gat ggc tcg cgc tcg ccg ctg cgc ggc ctg ctg			624
Trp Val Leu Ala Cys Asp Gly Ser Arg Ser Pro Leu Arg Gly Leu Leu			
195	200	205	
ggc cag gaa agc cat ggc cgc atc ttc cgc gac cgc ttc ctg atc gcc			672
Gly Gln Glu Ser His Gly Arg Ile Phe Arg Asp Arg Phe Leu Ile Ala			
210	215	220	
gac gtg aag atg cac gcc gaa ttc ccc acc gag cgc tgg ttc tgg ttc			720
Asp Val Lys Met His Ala Glu Phe Pro Thr Glu Arg Trp Phe Trp Phe			
225	230	235	240
gac ccg ccc ttc cac ccg ggc cag agc gtg ctg ctg cac cgc cag ccc			768
Asp Pro Pro Phe His Pro Gly Gln Ser Val Leu Leu His Arg Gln Pro			
245	250	255	
gac gat gtc tgg cgc atc gac ttc cag ctg ggc tgg gac gcg gac ccc			816
Asp Asp Val Trp Arg Ile Asp Phe Gln Leu Gly Trp Asp Ala Asp Pro			
260	265	270	
gag gaa gag aaa aag ccc gag aac atc gtg ccg cgc atc cgc gcc ctg			864
Glu Glu Lys Lys Pro Glu Asn Ile Val Pro Arg Ile Arg Ala Leu			
275	280	285	
ctg ggc aag gac gcg ccc ttc gag ctg gaa tgg gcc agc gtc tac acc			912
Leu Gly Lys Asp Ala Pro Phe Glu Leu Glu Trp Ala Ser Val Tyr Thr			
290	295	300	
ttc gcc tgc ctg cgc atg gac cgc ttc gtc cat ggc cgc gtg gtc ttt			960
Phe Ala Cys Leu Arg Met Asp Arg Phe Val His Gly Arg Val Val Phe			
305	310	315	320
gcg ggc gac agc gcc cac ggc gtc tcg ccg ttt ggc gca cgc ggc gcc			1008
Ala Gly Asp Ser Ala His Gly Val Ser Pro Phe Gly Ala Arg Gly Ala			
325	330	335	
aac agc ggc gtg cag gat gcc gag aac ctg gca tgg aag ctg gac cgc			1056
Asn Ser Gly Val Gln Asp Ala Glu Asn Leu Ala Trp Lys Leu Asp Arg			
340	345	350	
gtg ctg cgc ggc cag gcc gat gcc tcg ctg atc gcc acc tac ggc gcc			1104
Val Leu Arg Gly Gln Ala Asp Ala Ser Leu Ile Ala Thr Tyr Gly Ala			
355	360	365	
gag cgc gaa tac gcg gcc gac gag aac atc cgc aac tcc acg cgc gcc			1152
Glu Arg Glu Tyr Ala Ala Asp Glu Asn Ile Arg Asn Ser Thr Arg Ala			
370	375	380	
acc gac ttc atc acg ccc aag agc gag atc agc cgc ctg ttt cgc gac			1200

Thr Asp Phe Ile Thr Pro Lys Ser Glu Ile Ser Arg Leu Phe Arg Asp  
 385 390 395 400  
 gcc gtg ctg gac ctg gcg cgc gac cat gaa ttc gcg cgc cgc atc gtc 1248  
 Ala Val Leu Asp Leu Ala Arg Asp His Glu Phe Ala Arg Arg Ile Val  
 405 410 415  
 aac agc ggg cgg ctg tcc gtg ccg gcc acg ctg cac ggc tcc gcg ctc 1296  
 Asn Ser Gly Arg Leu Ser Val Pro Ala Thr Leu His Gly Ser Ala Leu  
 420 425 430  
 aac acg cct gac acc gac acc ttc gac gga acg cag ctg ccc ggc gcc 1344  
 Asn Thr Pro Asp Thr Asp Thr Phe Asp Gly Thr Gln Leu Pro Gly Ala  
 435 440 445  
 gtg ctg gcc gat gcg ccc atg cgc cgg ccc ggc gca gac ggc acg gcc 1392  
 Val Leu Ala Asp Ala Pro Met Arg Arg Pro Gly Ala Asp Gly Thr Ala  
 450 455 460  
 tgg ctg ctg cgc gca ctg gga ccg gac ttc acg ctg ctg cac ttc gac 1440  
 Trp Leu Leu Arg Ala Leu Gly Pro Asp Phe Thr Leu Leu His Phe Asp  
 465 470 475 480  
 ccc acg ccc gcc tgg gcg cag ggc ctg ccc ggc gtg ctc aac ctg tcc 1488  
 Pro Thr Pro Ala Trp Ala Gln Ala Leu Pro Gly Val Leu Asn Leu Ser  
 485 490 495  
 atc gcg gcc gag ggc gag ggc cat gcg cca gac gcc gac ctc atc gat 1536  
 Ile Ala Ala Glu Gly Glu Ala His Ala Pro Asp Ala Asp Leu Ile Asp  
 500 505 510  
 gcg cgc ggc ctg gcg gcc aaa cgc ctg gat gca cgc ccc ggc acc agc 1584  
 Ala Arg Gly Leu Ala Ala Lys Arg Leu Asp Ala Arg Pro Gly Thr Ser  
 515 520 525  
 tac ctg ctg cgg cct gac cag cat gtc tgc gcg cgc tgg cgc cgc ccc 1632  
 Tyr Leu Leu Arg Pro Asp Gln His Val Cys Ala Arg Trp Arg Arg Pro  
 530 535 540  
 gac gaa gcc agc gtg cgc gcc gcg ctg caa aga gac tgc ggc gcc gcc 1680  
 Asp Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala Leu Gln Arg Ala Cys Gly Ala Ala  
 545 550 555 560  
 gcc acg gcc tga 1692  
 Ala Thr Ala  
  
 <210> 8  
 <211> 564  
 <212>  
 <213> Pseudomonas acidovorans  
  
 <400> 8  
 Met Ser His Pro Ala Ile Ser Leu Gln Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Ile Gln Ser Ile His Ile Pro Tyr Glu Arg His Ala Asp Gln Asp  
 20 25 30  
 Ala Gly Ala Asp Thr Pro Ala Arg His Pro Val Val Ile Val Gly Ala  
 35 40 45  
 Gly Pro Val Gly Leu Ser Leu Ala Ile Asp Leu Ala Gln Arg Gly Gln  
 50 55 60  
 Arg Val Val Leu Leu Asp Asn Asp Cys Arg Leu Ser Thr Gly Ser Arg  
 65 70 75 80

Ala Ile Cys Phe Ser Lys Arg Thr Leu Glu Ile Trp Asp Arg Leu Gly  
 85 90 95  
 Val Gly Gln Pro Met Val Asp Lys Gly Val Ser Trp Asn Leu Gly Lys  
 100 105 110  
 Val Phe Phe Lys Asp Gln Pro Leu Tyr Arg Phe Asp Leu Leu Pro Glu  
 115 120 125  
 Asp Gly His Glu Arg Pro Ala Phe Ile Asn Leu Gln Gln Tyr Tyr Ala  
 130 135 140  
 Glu Ala Tyr Leu Val Glu Arg Ala Leu Gln Leu Pro Leu Ile Asp Leu  
 145 150 155 160  
 Arg Trp His Ser Lys Val Thr Ala Leu Glu Pro Gln Ala Glu Gly Ala  
 165 170 175  
 Leu Leu Thr Val Glu Thr Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ile Asp Ala Gln  
 180 185 190  
 Trp Val Leu Ala Cys Asp Gly Ser Arg Ser Pro Leu Arg Gly Leu Leu  
 195 200 205  
 Gly Gln Glu Ser His Gly Arg Ile Phe Arg Asp Arg Phe Leu Ile Ala  
 210 215 220  
 Asp Val Lys Met His Ala Glu Phe Pro Thr Glu Arg Trp Phe Trp Phe  
 225 230 235 240  
 Asp Pro Pro Phe His Pro Gly Gln Ser Val Leu Leu His Arg Gln Pro  
 245 250 255  
 Asp Asp Val Trp Arg Ile Asp Phe Gln Leu Gly Trp Asp Ala Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Glu Glu Lys Lys Pro Glu Asn Ile Val Pro Arg Ile Arg Ala Leu  
 275 280 285  
 Leu Gly Lys Asp Ala Pro Phe Glu Leu Glu Trp Ala Ser Val Tyr Thr  
 290 295 300  
 Phe Ala Cys Leu Arg Met Asp Arg Phe Val His Gly Arg Val Val Phe  
 305 310 315 320  
 Ala Gly Asp Ser Ala His Gly Val Ser Pro Phe Gly Ala Arg Gly Ala  
 325 330 335  
 Asn Ser Gly Val Gln Asp Ala Glu Asn Leu Ala Trp Lys Leu Asp Arg  
 340 345 350  
 Val Leu Arg Gly Gln Ala Asp Ala Ser Leu Ile Ala Thr Tyr Gly Ala  
 355 360 365  
 Glu Arg Glu Tyr Ala Ala Asp Glu Asn Ile Arg Asn Ser Thr Arg Ala  
 370 375 380  
 Thr Asp Phe Ile Thr Pro Lys Ser Glu Ile Ser Arg Leu Phe Arg Asp  
 385 390 395 400  
 Ala Val Leu Asp Leu Ala Arg Asp His Glu Phe Ala Arg Arg Ile Val  
 405 410 415  
 Asn Ser Gly Arg Leu Ser Val Pro Ala Thr Leu His Gly Ser Ala Leu  
 420 425 430  
 Asn Thr Pro Asp Thr Asp Thr Phe Asp Gly Thr Gln Leu Pro Gly Ala  
 435 440 445

Val Leu Ala Asp Ala Pro Met Arg Arg Pro Gly Ala Asp Gly Thr Ala  
 450 455 460

Trp Leu Leu Arg Ala Leu Gly Pro Asp Phe Thr Leu Leu His Phe Asp  
 465 470 475 480

Pro Thr Pro Ala Trp Ala Gln Ala Leu Pro Gly Val Leu Asn Leu Ser  
 485 490 495

Ile Ala Ala Glu Gly Glu Ala His Ala Pro Asp Ala Asp Leu Ile Asp  
 500 505 510

Ala Arg Gly Leu Ala Ala Lys Arg Leu Asp Ala Arg Pro Gly Thr Ser  
 515 520 525

Tyr Leu Leu Arg Pro Asp Gln His Val Cys Ala Arg Trp Arg Arg Pro  
 530 535 540

Asp Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala Leu Gln Arg Ala Cys Gly Ala Ala  
 545 550 555 560

Ala Thr Ala

<210> 9

<211> 966

<212> ADN

<213> Pseudomonas acidovorans

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(966)

<400> 9

atg acc acc aag acc ttt gcc tcc gcc gac ctc gaa atc aag cag	48
Met Thr Thr Lys Thr Phe Ala Ser Ala Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln	
1 5 10 15	

gtc agc ttc gac aag ctc tcc gag cac gcc tat gcc tac acg gcc gaa	96
Val Ser Phe Asp Lys Leu Ser Glu His Ala Tyr Ala Tyr Thr Ala Glu	
20 25 30	

ggc gac ccc aac acc ggc atc atc att ggc gac gac gcg gtg atg gtg	144
Gly Asp Pro Asn Thr Gly Ile Ile Gly Asp Asp Ala Val Met Val	
35 40 45	

atc gac acc cag gcc acg ccc gtc atg gcc cag gac gtg atc cgc cgc	192
Ile Asp Thr Gln Ala Thr Pro Val Met Ala Gln Asp Val Ile Arg Arg	
50 55 60	

atc cgt gag gtc acg gac aag ccc atc aag tac gtg acg ctg tcg cac	240
Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys Pro Ile Lys Tyr Val Thr Leu Ser His	
65 70 75 80	

tac cac gcg gtg cgc gtg ctg ggc gcc tcg gcc ttc ttc gcg gaa ggc	288
Tyr His Ala Val Arg Val Leu Gly Ala Ser Ala Phe Phe Ala Glu Gly	
85 90 95	

gcc gaa cac atc att gcc agc cag gac acc tac gac ctc atc gtg gag	336
Ala Glu His Ile Ile Ala Ser Gln Asp Thr Tyr Asp Leu Ile Val Glu	
100 105 110	

cgc ggc gag cag gac aag gcc agc gag atc ggc cgc ttt ccc cgc ctg	384
Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala Ser Glu Ile Gly Arg Phe Pro Arg Leu	
115 120 125	

ttc cag aac gtg gaa agc gtg ccc gat ggc atg acc tgg ccc acc ctc	432
---	-----

Phe	Gln	Asn	Val	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Gly	Met	Thr	Trp	Pro	Thr	Leu	
130						135					140					
acc	ttc	acc	ggc	aag	atg	acg	ctg	tgg	ctg	ggc	aag	ctg	gaa	gtg	cag	480
Thr	Phe	Thr	Gly	Lys	Met	Thr	Leu	Trp	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Val	Gln	
145					150					155				160		
atc	ctg	cag	ctg	ggc	cgc	ggc	cac	acc	aag	ggc	gac	acc	gtg	gtc	tgg	528
Ile	Leu	Gln	Leu	Gly	Arg	Gly	His	Thr	Lys	Gly	Asp	Thr	Val	Val	Trp	
					165				170				175			
ctg	ccc	cag	gac	aag	gtg	ctg	ttc	agc	ggc	gac	ctg	gtg	gag	ttc	ggc	576
Leu	Pro	Gln	Asp	Lys	Val	Leu	Phe	Ser	Gly	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Gly	
					180			185				190				
gcc	acg	ccc	tat	gcg	ggc	gat	gcc	tac	ttc	cag	gac	tgg	ccg	cac	acg	624
Ala	Thr	Pro	Tyr	Ala	Gly	Asp	Ala	Tyr	Phe	Gln	Asp	Trp	Pro	His	Thr	
					195			200				205				
ctg	gac	gcc	atc	gcc	gcc	ctg	cag	ccc	gaa	aag	ctc	gtg	ccc	ggc	cgg	672
Leu	Asp	Ala	Ile	Ala	Ala	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	Leu	Val	Pro	Gly	Arg	
					210			215				220				
ggc	gcc	gcf	ctg	cag	acg	ccg	gcc	gag	gtg	cag	gcc	ggc	ctg	gcc	ggc	720
Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Glu	Val	Gln	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	
					225			230			235			240		
acg	cgc	gac	ttc	atc	agc	gac	ctg	tgg	acc	gag	gtc	aag	gcc	ggc	gcc	768
Thr	Arg	Asp	Phe	Ile	Ser	Asp	Leu	Trp	Thr	Glu	Val	Lys	Ala	Gly	Ala	
					245			250			255					
gat	gcc	cag	cag	gac	ctg	cgc	aag	gtc	tac	gag	gcc	gcc	ttc	gcc	aag	816
Asp	Ala	Gln	Gln	Asp	Leu	Arg	Lys	Val	Tyr	Glu	Ala	Ala	Phe	Ala	Lys	
					260			265			270					
ctg	cag	ccc	aag	tac	ggc	cag	tgg	gtg	atc	ttc	aac	cac	tgc	atg	ccc	864
Leu	Gln	Pro	Lys	Tyr	Gly	Gln	Trp	Val	Ile	Phe	Asn	His	Cys	Met	Pro	
					275			280			285					
ttc	gat	gtg	acc	cgc	gcc	tat	gac	gag	gca	tgc	ggc	cac	gcc	gac	cca	912
Phe	Asp	Val	Thr	Arg	Ala	Tyr	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly	His	Ala	Asp	Pro	
					290			295			300					
cgc	atc	tgg	acc	gcc	gag	cgc	gac	cgc	cag	atg	tgg	ctg	gcf	ctc	gaa	960
Arg	Ile	Trp	Thr	Ala	Glu	Arg	Asp	Arg	Gln	Met	Trp	Leu	Ala	Leu	Glu	
					305			310			315			320		
ggc	tga														966	
Gly																

<210> 10  
<211> 322  
<212>

<213> Pseudomonas acidovorans

<400> 10

Met Thr Thr Lys Thr Phe Ala Ser Ala Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln  
1 5 10 15

Val Ser Phe Asp Lys Leu Ser Glu His Ala Tyr Ala Tyr Thr Ala Glu  
20 25 30

Gly Asp Pro Asn Thr Gly Ile Ile Gly Asp Asp Ala Val Met Val  
35 40 45

Ile Asp Thr Gln Ala Thr Pro Val Met Ala Gln Asp Val Ile Arg Arg  
50 55 60

Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys Pro Ile Lys Tyr Val Thr Leu Ser His  
 65                   70                   75                   80

Tyr His Ala Val Arg Val Leu Gly Ala Ser Ala Phe Phe Ala Glu Gly  
 85                   90                   95

Ala Glu His Ile Ile Ala Ser Gln Asp Thr Tyr Asp Leu Ile Val Glu  
 100               105               110

Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala Ser Glu Ile Gly Arg Phe Pro Arg Leu  
 115               120               125

Phe Gln Asn Val Glu Ser Val Pro Asp Gly Met Thr Trp Pro Thr Leu  
 130               135               140

Thr Phe Thr Gly Lys Met Thr Leu Trp Leu Gly Lys Leu Glu Val Gln  
 145               150               155               160

Ile Leu Gln Leu Gly Arg Gly His Thr Lys Gly Asp Thr Val Val Trp  
 165               170               175

Leu Pro Gln Asp Lys Val Leu Phe Ser Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly  
 180               185               190

Ala Thr Pro Tyr Ala Gly Asp Ala Tyr Phe Gln Asp Trp Pro His Thr  
 195               200               205

Leu Asp Ala Ile Ala Ala Leu Gln Pro Glu Lys Leu Val Pro Gly Arg  
 210               215               220

Gly Ala Ala Leu Gln Thr Pro Ala Glu Val Gln Ala Gly Leu Ala Gly  
 225               230               235               240

Thr Arg Asp Phe Ile Ser Asp Leu Trp Thr Glu Val Lys Ala Gly Ala  
 245               250               255

Asp Ala Gln Gln Asp Leu Arg Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys  
 260               265               270

Leu Gln Pro Lys Tyr Gly Gln Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro  
 275               280               285

Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro  
 290               295               300

Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu  
 305               310               315               320

Gly

<210> 11  
<211> 966  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: mutant  
d'HPAC de *P. acidovorans*

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)...(966)

<400> 11  
atg tcc acc aag acc ttt gcc tcc gcc gcc gac ctc gaa atc aag cag      48  
Met Ser Thr Lys Thr Phe Ala Ser Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln

1	5	10	15		
gtc agc ttc gac aag ctc tcc gag cac gcc tat	gcc tac acg	gcc gaa		96	
Val Ser Phe Asp Lys Leu Ser Glu His Ala Tyr	Ala Tyr Thr Ala	Glu			
20	25	30			
ggc gac ccc aac acc ggc atc atc att	ggc gac gac	gca gtg atg	gtg	144	
Gly Asp Pro Asn Thr Gly Ile Ile Gly Asp Asp	Ala Val Met Val				
35	40	45			
atc gac acc cag gcc acg ccc gtc atg	gcc cag	gtg atc	cgc cgc	192	
Ile Asp Thr Gln Ala Thr Pro Val Met Ala	Gln Asp Val	Ile Arg Arg			
50	55	60			
atc cgt gag gtc acg gac aag ccc atc aag	tac gtg acg	ctg tcg cac		240	
Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys Pro Ile Lys	Tyr Val Thr Leu Ser His				
65	70	75	80		
tac cac gcg gtg cgc gtg ctg ggc gcc tcg	gcc ttc ttc	gcg gaa ggc		288	
Tyr His Ala Val Arg Val Leu Gly Ala Ser	Ala Phe Phe Ala	Glu Gly			
85	90	95			
gcc gaa cac atc att	gcc agc cag	gac acc tac	gac ctc atc	gtg gag	336
Ala Glu His Ile Ile Ala Ser Gln Asp Thr	Tyr Asp Leu Ile	Val Glu			
100	105	110			
cgc ggc gag cag gac aag gcc agc gag	atc ggc cgc	ttt ccc cgc ctg		384	
Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala Ser Glu Ile	Gly Arg Phe Pro Arg Leu				
115	120	125			
ttc cag aac gtg gaa agc gtg ccc gat	ggc atg acc	tgg ccc acc ctc		432	
Phe Gln Asn Val Glu Ser Val Pro Asp Gly	Met Thr Trp Pro Thr	Leu			
130	135	140			
acc ttc acc ggc aag atg acg ctg tgg ctg	ggc aag	ctg gaa gtg cag		480	
Thr Phe Thr Gly Lys Met Thr Leu Trp Leu	Gly Lys Leu Glu Val	Gln			
145	150	155	160		
atc ctg cag ctg ggc cgc ggc cac acc aag	ggc gac acc	gtg gtc tgg		528	
Ile Leu Gln Leu Gly Arg Gly His Thr Lys	Gly Asp Thr Val Val Trp				
165	170	175			
ctg ccc cag gac aag gtg ctg ttc	agc ggc gac	ctg gtg gag	ttc ggc	576	
Leu Pro Gln Asp Lys Val Leu Phe Ser	Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly				
180	185	190			
gcc acg ccc tat	gac ggc gat	gcc tac ttc	cag gac	tgg ccg cac acg	624
Ala Thr Pro Tyr Ala Gly Asp Ala Tyr	Phe Gln Asp Trp Pro	His Thr			
195	200	205			
ctg gac acc atc gcc gcc	ctg cag ccc gaa	aag ctc gtg ccc	ggc cgg	672	
Leu Asp Thr Ile Ala Ala Leu Gln Pro Glu	Lys Leu Val Pro	Gly Arg			
210	215	220			
ggc gcc gcg ctg cag acg	ccg gcc gag	gtg cag	gcc ggc ctg	gcc ggc	720
Gly Ala Ala Leu Gln Thr Pro Ala Glu Val	Gln Ala Gly Leu Ala	Gly			
225	230	235	240		
acg cgc gac ttc atc	agc gac	ctg tgg acc	gag gtc	aag gcc ggc gcc	768
Thr Arg Asp Phe Ile Ser Asp Leu Trp	Thr Glu Val Lys	Ala Gly Ala			
245	250	255			
gat gcc cag cag gac	ctg cgc aag	gtc tac	gag gcc	ttc gcc aag	816
Asp Ala Gln Asp Leu Arg Lys Val	Tyr Glu Ala Ala	Phe Ala Lys			
260	265	270			
ctg cag ccc aag tac	ggc cag	tgg gtg atc	ttc aac	cac tgc atg ccc	864
Leu Gln Pro Lys Tyr Gly Gln Trp Val	Ile Phe Asn His Cys	Met Pro			

275

280

285

ttc gat gtg acc cgc gcc tat gac gag gca tcg ggc cac gcc gac cca 912  
 Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro  
 290 295 300

cgc atc tgg acc gcc gag cgc gac cgc cag atg tgg ctg gcg ctc gaa 960  
 Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu  
 305 310 315 320

ggc tga 966  
 Gly

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 322

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: mutant  
d'HPAC de *P. acidovorans*

&lt;400&gt; 12

Met	Ser	Thr	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Ala	Ala	Asp	Leu	Glu	Ile	Lys	Gln
1														15	

Val	Ser	Phe	Asp	Lys	Leu	Ser	Glu	His	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Ala	Glu
					20								30		

Gly	Asp	Pro	Asn	Thr	Gly	Ile	Ile	Gly	Asp	Asp	Ala	Val	Met	Val	
					35			40					45		

Ile	Asp	Thr	Gln	Ala	Thr	Pro	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Val	Ile	Arg	Arg
					50			55					60		

Ile	Arg	Glu	Val	Thr	Asp	Lys	Pro	Ile	Lys	Tyr	Val	Thr	Leu	Ser	His
					65			70					80		

Tyr	His	Ala	Val	Arg	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Ala	Phe	Phe	Ala	Glu	Gly
					85				90				95		

Ala	Glu	His	Ile	Ile	Ala	Ser	Gln	Asp	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ile	Val	Glu
					100			105					110		

Arg	Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Ala	Ser	Glu	Ile	Gly	Arg	Phe	Pro	Arg	Leu
					115			120					125		

Phe	Gln	Asn	Val	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Gly	Met	Thr	Trp	Pro	Thr	Leu
					130			135					140		

Thr	Phe	Thr	Gly	Lys	Met	Thr	Leu	Trp	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Val	Gln
					145			150					160		

Ile	Leu	Gln	Leu	Gly	Arg	Gly	His	Thr	Lys	Gly	Asp	Thr	Val	Val	Trp
					165			170					175		

Leu	Pro	Gln	Asp	Lys	Val	Leu	Phe	Ser	Gly	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Gly
					180			185				190			

Ala	Thr	Pro	Tyr	Ala	Gly	Asp	Ala	Tyr	Phe	Gln	Asp	Trp	Pro	His	Thr
					195			200					205		

Leu	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	Leu	Val	Pro	Gly	Arg
					210			215					220		

Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Glu	Val	Gln	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly
					225			230				235		240	

Thr	Arg	Asp	Phe	Ile	Ser	Asp	Leu	Trp	Thr	Glu	Val	Lys	Ala	Gly	Ala
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

245	250	255
Asp Ala Gln Gln Asp Leu Arg Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys 260	265	270
Leu Gln Pro Lys Tyr Gly Gln Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro 275	280	285
Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro 290	295	300
Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu 305	310	315
Gly.		
<210> 13		
<211> 966		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Description de la séquence artificielle: mutant		
d'HPAC de <i>P. acidovorans</i>		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)..(966)		
<400> 13		
atg tcc acc aag acc ttt gcc tcc gcc gac ctc gaa atc aag cag Met Ser Thr Lys Thr Phe Ala Ser Ala Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln 1 5 10 15		48
gtc agc ttc gac aag ctc tcc gag cac gcc tat gcc tac acg gcc gaa Val Ser Phe Asp Lys Leu Ser Glu His Ala Tyr Ala Tyr Thr Ala Glu 20 25 30		96
ggc gac ccc aac acc ggc atc atc att ggc gac gac gcg gtg atg gtg Gly Asp Pro Asn Thr Gly Ile Ile Ile Gly Asp Asp Ala Val Met Val 35 40 45		144
atc gac acc cag gcc acg ccc gtc atg gcc tag gac gtg atc cgc cgc Ile Asp Thr Gln Ala Thr Pro Val Met Ala Gln Asp Val Ile Arg Arg 50 55 60		192
atc cgt gag gtc acg gac aag ccc atc aag tac gtg acg ctg tcg cac Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys Pro Ile Lys Tyr Val Thr Leu Ser His 65 70 75 80		240
tac cac gcg gtg cgc gtg ctg ggc gcc tcg gcc ttc ttc gcg gaa ggc Tyr His Ala Val Arg Val Leu Gly Ala Ser Ala Phe Phe Ala Glu Gly 85 90 95		288
gcc gaa cac atc att gcc agc cag gac acc tac gac ctc atc gtg gag Ala Glu His Ile Ile Ala Ser Gln Asp Thr Tyr Asp Leu Ile Val Glu 100 105 110		336
cgc ggc gag cag gac aag gcc agc gag atc ggc cgc ttt ccc cgc ctg Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala Ser Glu Ile Gly Arg Phe Pro Arg Leu 115 120 125		384
ttc cag aac gtg gaa agc gtg ccc gat ggc atg acc tgg ccc acc ctc Phe Gln Asn Val Glu Ser Val Pro Asp Gly Met Thr Trp Pro Thr Leu 130 135 140		432
acc ttc acc ggc aag atg acg ctg tgg ctg ggc aag ctg gaa gtg cag		480

Thr Phe Thr Gly Lys Met Thr Leu Trp Leu Gly Lys Leu Glu Val Gln  
 145 150 155 160  
 atc ctg cag ctg ggc cgc ggc cac acc aag ggc gac acc gtg gtc tgg 528  
 Ile Leu Gln Leu Gly Arg Gly His Thr Lys Gly Asp Thr Val Val Trp  
 165 170 175  
 ctg ccc cag gac aag gtg ctg ttc agc ggc gac ctg gtg gag ttc ggc 576  
 Leu Pro Gln Asp Lys Val Leu Phe Ser Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly  
 180 185 190  
 gcc acg ccc tat gcg ggc gat gcc tac ttc cag gac tgg ccg cac acg 624  
 Ala Thr Pro Tyr Ala Gly Asp Ala Tyr Phe Gln Asp Trp Pro His Thr  
 195 200 205  
 ctg gac gcc atc gcc ggc ctg cag ccc gaa aag ctc gtg ccc ggc cgg 672  
 Leu Asp Ala Ile Ala Ala Leu Gln Pro Glu Lys Leu Val Pro Gly Arg  
 210 215 220  
 ggc gcc gcg ctg cag acg ccc gcc gag gtg cag gcc ggc ctg gcc ggc 720  
 Gly Ala Ala Leu Gln Thr Pro Ala Glu Val Gln Ala Gly Leu Ala Gly  
 225 230 235 240  
 acg cgc gac ttc atc agc gac ctg tgg acc gag gtc aag gcc ggc gcc 768  
 Thr Arg Asp Phe Ile Ser Asp Leu Trp Thr Glu Val Lys Ala Gly Ala  
 245 250 255  
 gat gcc cag cag gac ctg cgc aag gtc tac gag gcc gcc ttc gcc aag 816  
 Asp Ala Gln Gln Asp Leu Arg Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys  
 260 265 270  
 ctg cag ccc aag tac ggc cag tgg gtg atc ttc aac cac tgc atg ccc 864  
 Leu Gln Pro Lys Tyr Gly Gln Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro  
 275 280 285  
 ttc gat gtg acc cgc gcc tat gac gag gca tcg ggc cac gcc gac cca 912  
 Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro  
 290 295 300  
 cgc atc tgg acc gcc gag cgc gac cgc cag atg tgg ctg gcg ctc gaa 960  
 Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu  
 305 310 315 320  
 ggc tga  
 Gly 966

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 322

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: mutant  
d'HPAC de P. acidovorans

&lt;400&gt; 14

Met	Ser	Thr	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Ala	Ala	Asp	Leu	Glu	Ile	Lys	Gln
1				5				10					15		

Val	Ser	Phe	Asp	Lys	Leu	Ser	Glu	His	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Ala	Glu
				20			25					30			

Gly	Asp	Pro	Asn	Thr	Gly	Ile	Ile	Gly	Asp	Asp	Ala	Val	Met	Val
			35			40		45						

Ile	Asp	Thr	Gln	Ala	Thr	Pro	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Val	Ile	Arg	Arg
	50				55			60							

Ile	Arg	Glu	Val	Thr	Asp	Lys	Pro	Ile	Lys	Tyr	Val	Thr	Leu	Ser	His

65	70	75	80
Tyr His Ala Val Arg Val Leu Gly Ala Ser Ala Phe Phe Ala Glu Gly			
85		90	95
Ala Glu His Ile Ile Ala Ser Gln Asp Thr Tyr Asp Leu Ile Val Glu			
100		105	110
Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala Ser Glu Ile Gly Arg Phe Pro Arg Leu			
115		120	125
Phe Gln Asn Val Glu Ser Val Pro Asp Gly Met Thr Trp Pro Thr Leu			
130		135	140
Thr Phe Thr Gly Lys Met Thr Leu Trp Leu Gly Lys Leu Glu Val Gln			
145		150	155
Ile Leu Gln Leu Gly Arg Gly His Thr Lys Gly Asp Thr Val Val Trp			
165		170	175
Leu Pro Gln Asp Lys Val Leu Phe Ser Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly			
180		185	190
Ala Thr Pro Tyr Ala Gly Asp Ala Tyr Phe Gln Asp Trp Pro His Thr			
195		200	205
Leu Asp Ala Ile Ala Ala Leu Gln Pro Glu Lys Leu Val Pro Gly Arg			
210		215	220
Gly Ala Ala Leu Gln Thr Pro Ala Glu Val Gln Ala Gly Leu Ala Gly			
225		230	235
Thr Arg Asp Phe Ile Ser Asp Leu Trp Thr Glu Val Lys Ala Gly Ala			
245		250	255
Asp Ala Gln Gln Asp Leu Arg Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys			
260		265	270
Leu Gln Pro Lys Tyr Gly Gln Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro			
275		280	285
Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro			
290		295	300
Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu			
305		310	315
320			
Gly			

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 3549

&lt;212&gt; ADN.

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: cassette  
d'expression

&lt;220&gt;

<221> promoter  
<222> (1)..(928)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (965)..(2647)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; terminator

&lt;222&gt; (2811)..(3549)

&lt;400&gt; 15

tgcatgccta ggtcgaggag aaatatgagt cgaggcatgg atacactaaag ttcccctgaa 60  
 gtgagcatga tcttgatgc tgagatgatt cccagagcaa gatagttgt gctcaagtg 120  
 acacaattgt aatgaaacca ccactcaacg aatttacttg tggcttgac atgtcgtgtg 180  
 ctctgttgtt atttgtgagt gccgggttgtt aattttttt gtaatgtga ttttaaaacc 240  
 tcttatgtaa atagttactt tatctattga agtgtgttct tgtggtctat agtttctcaa 300  
 agggaaatata aatgttgac atccccattna caattgataa cttggatatac acaaactttg 360  
 taaatttgtt gatatttagt gtcgaaagaa ggcaatacc attgtatgtt ccaatataa 420  
 tatacaatacg ataacttgat aatactaaca tatgattgtc attgttttc cagtagtcaat 480  
 atacattaag ctactacaaa attagtataa atcactatatataaattttttt tttcgggttgt 540  
 aacttgtaat tcgtgggttt taaaataaaa agcatgtgaa aattttcaaa taatgtgatg 600  
 gcgcaattttt attttcccgag ttccaaaata ttggcccttc attaccctaa tttgtggcgc 660  
 cacatgtaaa acaaaagacg attcttagtg gctatcaactg ccatcacgacg gatcaataat 720  
 atgaaccgtc gattaaaaca gatcgacggt ttatacatca ttttattgtt cacacggatc 780  
 gatatctcag ccgttagatt taatatgcga tctgattgtc caaaaaatag actctccgtc 840  
 tttgcctata aaaacaattt cacatcttcc tcacccaaat ctactcttaa ccgttcttct 900  
 tcttctacag acatcaattt ctctcgactc tagaggatcc aagcttatacg atttcgaacc 960  
 cctc atg act tca ctt aca gtg tcc ggc cggtt gtc ctc agc 1009  
 Met Thr Ser Leu Thr Val Ser Gly Arg Val Ala Gln Val Leu Ser  
 1 5 10 15

agc tat gtc agc gat gtg ttc ggtt gtc atg ggc aac gga aac gtc tac 1057  
 Ser Tyr Val Ser Asp Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr  
 20 25 30

ttc ctg gac gcc gcc gag aag gag ggc ctc cgc ttc acg gec gta cgc 1105  
 Phe Leu Asp Ala Ala Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg  
 35 40 45

cat gaa ggt gcc gcc atc gcg gcg gac gac gcc tac tat cgg gca tcc 1153  
 His Glu Gly Ala Ala Ile Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser  
 50 55 60

ggg cgc ctg gcg gcg ggg acc acc acc tac ggc ccc ggt tac acc aac 1201  
 Gly Arg Leu Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn  
 65 70 75

gcc ctg acg gcc ctc gcc gag gcg gtc cag gcg cag atc ccc gtg gtg 1249  
 Ala Leu Thr Ala Leu Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val  
 80 85 90 95

ctc gtc acc ggg gac gcc ccg agc agc ggc gcc cgg cct tgg gac gtg 1297  
 Leu Val Thr Gly Asp Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val  
 100 105 110

gac cag gcc gcg atc gcc gcc ggg ctg ggg gcg gcg acc ttc acg gtc 1345  
 Asp Gln Ala Ala Ile Ala Ala Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val  
 115 120 125

acc cgt gaa gcc gca ggc tcc atc acg cag gaa gcg gtg gag tac gca Thr Arg Glu Ala Ala Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala 130 135 140	1393
ctt gcc cgg cgg acc gcc gtc gtg atc gcc gtt cca tac gac ctg tcg Leu Ala Arg Arg Thr Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser 145 150 155	1441
gcc ctt gag gcg gcg gag gaa gat ctt ccc gtg ccg ccg gcg gcc tcg Ala Leu Glu Ala Ala Glu Glu Asp Leu Pro Val Pro Pro Ala Ala Ser 160 165 170 175	1489
gtt ccg gac gcc atc ggc ggc gga ctc gga ccg gcg gcc gaa gtg cgg Val Pro Asp Ala Ile Gly Gly Leu Gly Arg Ala Ala Glu Val Arg 180 185 190	1537
gcg gcc gaa ttg ctg gcg ggc gcg aag ccg ccg ctc atc ctt gcc ggc Ala Ala Glu Leu Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly 195 200 205	1585
ccg ggt gcg cac ctc gca gga acc ggc ccc gaa ctc ccg gaa ctc gcc Arg Gly Ala His Leu Ala Gly Thr Gly Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala 210 215 220	1633
gac cgc ctc ggc gcg ctc acg gcc ggc acc gca ctg gcg ctg aac ctg Asp Arg Leu Gly Ala Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu 225 230 235	1681
ctg cag ggc gag ggg tac ctc ggc gtc gcg ggc ggc ttc ggc acg gat Leu Gln Gly Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp 240 245 250 255	1729
acc gcc gcc ggg ctc atg ggc gag gcg gac gtg gtg ctc gtg gcg gga Thr Ala Ala Gly Leu Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly 260 265 270	1777
gcc agc ctg acc ccc ttc acc atg cgc ttc ggc cac ctg atc gcc ccg Ala Ser Leu Thr Pro Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro 275 280 285	1825
gac gcc acc gtg atc cag atc gac acc gcc atg gag ccg acg gac ccg Asp Ala Thr Val Ile Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro 290 295 300	1873
cgg gtg gac ctg ttt gtc agt gcg gac gcg aag gcc gct gcc ggc cgg Arg Val Asp Leu Phe Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Ala Gly Arg 305 310 315	1921
atc ctc cgg ctg ctg gat gac gcc ggc ggg gcc aat gcg tcg aag gcc Ile Leu Arg Leu Leu Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala 320 325 330 335	1969
tgg cgc gcg gaa gca ctc aag cgt ctg gcc gaa gga ccc tgc cac cac Trp Arg Ala Glu Ala Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His 340 345 350	2017
ccc ggc acc gca gag acc acg gac ggc cgc ctt gac ccc cgg ccg ctt Pro Gly Thr Ala Glu Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu 355 360 365	2065
gct tcg gca ctg gat gcc gtc ctg ccg gaa cgc ccg acc gtg gtc cag Ala Ser Ala Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln 370 375 380	2113
gac ggc ggg cac ttc ctg ggc tgg gca ccc atg tac tgg cgc atc ccc Asp Gly Gly His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro 385 390 395	2161

cgt cct cag gac ctg gtc atg gtg ggg acc gcg tac cag tcg atc ggg 2209  
 Arg Pro Gln Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly  
 400 405 410 415

ctt ggc ctg gcc agc gcc gtg ggg gcg tcc cgg gcc gtg gac gac ggc 2257  
 Leu Gly Leu Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly  
 420 425 430

aat atc ctg gtg ctg gcg ggc gac ggc gga ttc ctg atg ggc ctg 2305  
 Asn Ile Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu  
 435 440 445

tcc gac ctg gaa tcg ctc gtg ggc gcg agc agc gac gtc gtg gtg 2353  
 Ser Asp Leu Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val  
 450 455 460

atc tac aac gac gcc gac tac ggg gcc gag atc cat cag tac ggc tca 2401  
 Ile Tyr Asn Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser  
 465 470 475

cgg ggg ctc acc gaa aag ccc atg ctg atc ccc gaa gtg gac ttc agc 2449  
 Arg Gly Leu Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser  
 480 485 490 495

ggg att gcc cgc gcg atc ggg gcg gaa tcc gca atc atc cgc aag ctg 2497  
 Gly Ile Ala Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu  
 500 505 510

tcg gac ctc tcc gcg ctc acg gac tgg atc gag gcc ggc gcc agg gga 2545  
 Ser Asp Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly  
 515 520 525

acc ttc gtg gcc gac tgc cgc atc acc tca agc gtc cgg gcc ccg tgg 2593  
 Thr Phe Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp  
 530 535 540

ctg agc gaa tgg atg agg gcc tcg caa gcg gcg aag gag gcg gtg gcg 2641  
 Leu Ser Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala  
 545 550 555

ggc tag ggccggcctc gtcgaaatgc cgccctccaa cccaaactcag taccagctca 2697  
 Gly  
 560

gggcgttctc agggctggga acgccctgag ctgctactca tttgttgcggaa ctcgaggctcg 2757  
 acggtatcga taagcttgat atcgaattcc tgcagccccgg gggatccact agggatccc 2817  
 ccgatcccg tttgtgtttt ctgggtttct cacttaagcg tctgcgtttt acttttgtat 2877  
 tgggtttggc gtttagtagt ttgcggtagc gttcttggta tgtgttaatta cgcttttct 2937  
 tcttgcgttca gcagttcgg ttgaaatata aatcgaatca agttcactt tatcagcggtt 2997  
 gttttaaatt ttggcattaa attggtaaaa attgcttcaa tttgtatct aaatagaaga 3057  
 gacaacatga aattcgactt ttgacctcaa atcttcgaac atttatttcc tgatttcacg 3117  
 atggatgagg ataacgaaag ggcgttccct atgtccggga aagttccctt agaagacaat 3177  
 gagcaaagct actgaaacgc ggacacgacg tcgcattggt acggatatga gttaaaccga 3237  
 ctcaattccct ttatataagac ataaaccgat ttgggttaaa gtgttaacagt gagctgat 3297  
 aaaaccgaaa caaaccggta caagttgat tgagcaactt gatgacaaac ttcagaattt 3357  
 tggttattga atgaaaatca tagtctaatac gtaaaaaatg tacagaagaa aagcttagac 3417

agaacaaaga ttctatatcc tggttccaat ttatcatcgc tttaacgtcc ctcagattt 3477  
 atcggtctgc aggaattcgg cctgactgat cattaaaca ctagttctag agcggccgcc 3537  
 accgcggtgtgg ag 3549

<210> 16  
 <211> 241

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: cassette d'expression

&lt;400&gt; 16

Leu	Arg	Leu	Leu	Asp	Asp	Ala	Ala	Gly	Ala	Asn	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp
1				5					10					15	

Arg	Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Arg	Leu	Ala	Glu	Gly	Pro	Cys	His	His	Pro
				20				25					30		

Gly	Thr	Ala	Glu	Thr	Thr	Asp	Gly	Arg	Leu	Asp	Pro	Arg	Ala	Leu	Ala
				35			40					45			

Ser	Ala	Leu	Asp	Ala	Val	Leu	Pro	Glu	Arg	Arg	Thr	Val	Val	Gln	Asp
				50			55				60				

Gly	Gly	His	Phe	Leu	Gly	Trp	Ala	Pro	Met	Tyr	Trp	Arg	Ile	Pro	Arg
				65		70			75			80			

Pro	Gln	Asp	Leu	Val	Met	Val	Gly	Thr	Ala	Tyr	Gln	Ser	Ile	Gly	Leu
				85				90				95			

Gly	Leu	Ala	Ser	Ala	Val	Gly	Ala	Ser	Arg	Ala	Val	Asp	Asp	Gly	Asn
				100				105				110			

Ile	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Gly	Asp	Gly	Gly	Phe	Leu	Met	Gly	Leu	Ser
				115			120				125				

Asp	Leu	Glu	Ser	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Val	Val	Ile
				130			135				140				

Tyr	Asn	Asp	Ala	Ala	Tyr	Gly	Ala	Glu	Ile	His	Gln	Tyr	Gly	Ser	Arg
				145			150				155			160	

Gly	Leu	Thr	Glu	Lys	Pro	Met	Leu	Ile	Pro	Glu	Val	Asp	Phe	Ser	Gly
				165				170				175			

Ile	Ala	Arg	Ala	Ile	Gly	Ala	Glu	Ser	Ala	Ile	Ile	Arg	Lys	Leu	Ser
				180				185				190			

Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	Thr	Asp	Trp	Ile	Glu	Ala	Gly	Ala	Arg	Gly	Thr
				195			200				205				

Phe	Val	Ala	Asp	Cys	Arg	Ile	Thr	Ser	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Trp	Leu
				210			215				220				

Ser	Glu	Trp	Met	Arg	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Val	Ala	Gly
				225			230				235			240	

<210> 17  
 <211> 2838  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: cassette

## d'expression

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(807)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (847)..(2538)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; terminator

&lt;222&gt; (2539)..(2838)

&lt;400&gt; 17

ggccccccct cgagcccaca gatggtaga gaggcttacg cagcaggctc catcaagacg 60  
 atctaccga gcaataatct ccaggaaatc aaatacccttc ccaagaaggt taaagatgca 120  
 gtcaaaagat tcaggactaa ctgcattcaag aacacagaga aagatataatt tctcaagatc 180  
 agaagtacta ttccaggatg gacgattcaa ggcttgcttc acaaacccaag gcaagtaata 240  
 gagattggag tctctaaaaa ggtagttccc actgaatcaa aggccatgga gtcaaagatt 300  
 caaatagagg acctaacaga actcgccgta aagactggcg aacagttcat acagagtctc 360  
 ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc 420  
 tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca gaagacaaa gggcaattga gactttcaa 480  
 caaagggtaa tatccggaaa cctccctcgga ttccattgcc cagctatctg tcactttatt 540  
 gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc tacaaatgcc atcattgcga taaagggaaag 600  
 gccatcggtg aagatgcctc tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg 660  
 agcatcggtgg aaaaagaaga cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtggta ttagatgtat 720  
 atctccactg acgtaaggaa tgacgcacaa tcccactatac cttcgcaaga cccttcctct 780  
 atataaggaa gttcatttca tttggagaga acacggggga ctctagagga tcagaggacg 840  
 aacaac atg tcc cac ccc gcc atc tcc ctg gaa gcg ctg cgc ggc agc 888  
 Met Ser His Pro Ala Ile Ser Leu Gln Ala Leu Arg Gly Ser  
 1 5 10

ggc gca gac ata cag tcc atc cac atc ccc tac gag cgc cat gcc gac 936  
 Gly Ala Asp Ile Gln Ser Ile His Ile Pro Tyr Glu Arg His Ala Asp  
 15 20 25 30

cag gac gcc ggt gcg gac acg ccc gcc cggtt cat ccc gtc gtc atc gtc 984  
 Gln Asp Ala Gly Ala Asp Thr Pro Ala Arg His Pro Val Val Ile Val  
 35 40 45

ggc gcc ggc ccc gtg ggc ctg tcg ctg gcc atc gac ctg gcc cag cgc 1032  
 Gly Ala Gly Pro Val Gly Leu Ser Leu Ala Ile Asp Leu Ala Gln Arg  
 50 55 60

ggc cag cgc gtg gtg ctg ctg gac aac gac tgc cgg ctg tcc acg ggc 1080  
 Gly Gln Arg Val Val Leu Leu Asp Asn Asp Cys Arg Leu Ser Thr Gly  
 65 70 75

tcg cgc gcc atc tgc ttt tcc aag cgc acg ctg gag atc tgg gac cgc 1128  
 Ser Arg Ala Ile Cys Phe Ser Lys Arg Thr Leu Glu Ile Trp Asp Arg  
 80 85 90

ctg ggc gtg ggc cag ccc atg gtg gac aag ggc gtg tcc tgg aac ctg 1176

Leu Gly Val Gly Gln Pro Met Val Asp Lys Gly Val Ser Trp Asn Leu			
95	100	105	110
ggc aag gtc ttc ttc aag gac cag ccg ctg tac cgc ttc gac ctg ctg			1224
Gly Lys Val Phe Phe Lys Asp Gln Pro Leu Tyr Arg Phe Asp Leu Leu			
115	120	125	
ccc gag gac ggc cac gag ccg gcc ttc atc aac ctg cag cag tac			1272
Pro Glu Asp Gly His Glu Arg Pro Ala Phe Ile Asn Leu Gln Gln Tyr			
130	135	140	
tac gcc gag gcc tat ctg gtc gag ccg gca ctg cag ctg ccg ctg atc			1320
Tyr Ala Glu Ala Tyr Leu Val Glu Arg Ala Leu Gln Leu Pro Leu Ile			
145	150	155	
gac ctg cgc tgg cac agc aag gtc acg gca ctg gag ccg cag gcc gag			1368
Asp Leu Arg Trp His Ser Lys Val Thr Ala Leu Glu Pro Gln Ala Glu			
160	165	170	
ggc gcg ctg ctg acc gtg gag acg cct gac ggc agc tac cgc atc gat			1416
Gly Ala Leu Leu Thr Val Glu Thr Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ile Asp			
175	180	185	190
gcg caa tgg gtc ctg gcc tgc gat ggc tcg cgc tcg ccg ctg cgc ggc			1464
Ala Gln Trp Val Leu Ala Cys Asp Gly Ser Arg Ser Pro Leu Arg Gly			
195	200	205	
ctg ctg ggc cag gaa agc cat ggc cgc atc ttc cgc gac cgc ttc ctg			1512
Leu Leu Gly Gln Glu Ser His Gly Arg Ile Phe Arg Asp Arg Phe Leu			
210	215	220	
atc gcc gac gtg aag atg cac gcc gaa ttc ccc acc gag cgc tgg ttc			1560
Ile Ala Asp Val Lys Met His Ala Glu Phe Pro Thr Glu Arg Trp Phe			
225	230	235	
tgg ttc gac ccg ccc ttc cac ccg ggc cag agc gtg ctg ctg cac cgc			1608
Trp Phe Asp Pro Pro Phe His Pro Gly Gln Ser Val Leu Leu His Arg			
240	245	250	
cag ccc gac gat gtc tgg cgc atc gac ttc cag ctg ggc tgg gac gcg			1656
Gln Pro Asp Asp Val Trp Arg Ile Asp Phe Gln Leu Gly Trp Asp Ala			
255	260	265	270
gac ccc gag gaa gag aaa aag ccc gag aac atc gtg ccg cgc atc cgc			1704
Asp Pro Glu Glu Glu Lys Lys Pro Glu Asn Ile Val Pro Arg Ile Arg			
275	280	285	
gcc ctg ctg ggc aag gac gcg ccc ttc gag ctg gaa tgg gcc agc gtc			1752
Ala Leu Leu Gly Lys Asp Ala Pro Phe Glu Leu Glu Trp Ala Ser Val			
290	295	300	
tac acc ttc gcc tgc ctg cgc atg gac cgc ttc gtc cat ggc cgc gtg			1800
Tyr Thr Phe Ala Cys Leu Arg Met Asp Arg Phe Val His Gly Arg Val			
305	310	315	
gtc ttt gcg ggc gac agc gcc cac ggc gtc tcg ccg ttt ggc gca cgc			1848
Val Phe Ala Gly Asp Ser Ala His Gly Val Ser Pro Phe Gly Ala Arg			
320	325	330	
ggc gcc aac agc ggc gtg cag gat gcc gag aac ctg gca tgg aag ctg			1896
Gly Ala Asn Ser Gly Val Gln Asp Ala Glu Asn Leu Ala Trp Lys Leu			
335	340	345	350
gac cgc gtg ctg cgc ggc cag gat gcc tcg ctg atc gcc acc tac			1944
Asp Arg Val Leu Arg Gly Gln Ala Asp Ala Ser Leu Ile Ala Thr Tyr			
355	360	365	
ggc gcc gag cgc gaa tac gcg gac gag aac atc cgc aac tcc acg			1992

<210> 18  
<211> 284

<212>

<213> Séquence artificielle  
<223> Description de la séquence artificielle: cassette d'expression

&lt;400&gt; 18

Ile	Val	Pro	Arg	Ile	Arg	Ala	Leu	Leu	Gly	Lys	Asp	Ala	Pro	Phe	Glu
1				5				10					15		

Leu	Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Tyr	Thr	Phe	Ala	Cys	Leu	Arg	Met	Asp	Arg
				20			25					30			

Phe	Val	His	Gly	Arg	Val	Val	Phe	Ala	Gly	Asp	Ser	Ala	His	Gly	Val
				35			40				45				

Ser	Pro	Phe	Gly	Ala	Arg	Gly	Ala	Asn	Ser	Gly	Val	Gln	Asp	Ala	Glu
				50			55				60				

Asn	Leu	Ala	Trp	Lys	Leu	Asp	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Asp	Ala
				65			70			75		80			

Ser	Leu	Ile	Ala	Thr	Tyr	Gly	Ala	Glu	Arg	Glu	Tyr	Ala	Ala	Asp	Glu
				85			90				95				

Asn	Ile	Arg	Asn	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Asp	Phe	Ile	Thr	Pro	Lys	Ser
				100			105				110				

Glu	Ile	Ser	Arg	Leu	Phe	Arg	Asp	Ala	Val	Leu	Asp	Leu	Ala	Arg	Asp
				115			120				125				

His	Glu	Phe	Ala	Arg	Arg	Ile	Val	Asn	Ser	Gly	Arg	Leu	Ser	Val	Pro
				130			135				140				

Ala	Thr	Leu	His	Gly	Ser	Ala	Leu	Asn	Thr	Pro	Asp	Thr	Asp	Thr	Phe
				145			150			155			160		

Asp	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Asp	Ala	Pro	Met	Arg
				165			170				175				

Arg	Pro	Gly	Ala	Asp	Gly	Thr	Ala	Trp	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Pro
				180			185				190				

Asp	Phe	Thr	Leu	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Thr	Pro	Ala	Trp	Ala	Gln	Ala
				195			200			205					

Leu	Pro	Gly	Val	Leu	Asn	Leu	Ser	Ile	Ala	Ala	Glu	Gly	Glu	Ala	His
				210			215				220				

Ala	Pro	Asp	Ala	Asp	Leu	Ile	Asp	Ala	Arg	Gly	Leu	Ala	Ala	Lys	Arg
				225			230			235			240		

Leu	Asp	Ala	Arg	Pro	Gly	Thr	Ser	Tyr	Leu	Leu	Arg	Pro	Asp	Gln	His
				245			250				255				

Val	Cys	Ala	Arg	Trp	Arg	Arg	Pro	Asp	Glu	Ala	Ser	Val	Arg	Ala	Ala
				260			265				270				

Leu	Gln	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala					
				275			280								

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 1839

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: cassette  
d'expression

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(547)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (574)..(1539)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; terminator

&lt;222&gt; (1540)..(1839)

&lt;400&gt; 19

ccccctcgag gtcgacggta ttgatcagct tccagaaggta aattatccaa gatgttagcat 60  
 caagaatcca atgttacgg gaaaaactat ggaagtatta tgtgagctca gcaagaagca 120  
 gatcaatatg cggcacatat gcaacctatg ttcaaaaatg aagaatgtac agataacaaga 180  
 tcctatactg ccagaatacg aagaagaata cgtagaaatt gaaaaagaag aaccaggcga 240  
 agaaaaagaat cttgaagacg taagcactga cgacaacaat gaaaagaaga agataaggc 300  
 ggtgattgtg aaagagacat agaggacaca tgtaaggtgg aaaatgtaa ggccgaaagt 360  
 aaccttatca caaaggaatc ttatccccca ctacttatcc ttttatattt ttccgtgtca 420  
 ttttgccct tgagtttcc tatataagga accaagttcg gcatttgtga aaacaagaaa 480  
 aaatttggtg taagctattt tcttgaagt actgaggata caacttcaga gaaatttgc 540  
 agtttgcaga tctgaattcg atgcaggatg cac atg tcc acc aag acc ttt gcc 594  
 Met Ser Thr Lys Thr Phe Ala  
 1 5

tcc gcc gcc gac ctc gaa atc aag cag gtc agc ttc gac aag ctc tcc 642  
 Ser Ala Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln Val Ser Phe Asp Lys Leu Ser  
 10 15 20

gag cac gcc tat gcc tac acg gcc gaa ggc gac ccc aac acc ggc atc 690  
 Glu His Ala Tyr Ala Tyr Thr Ala Glu Gly Asp Pro Asn Thr Gly Ile  
 25 30 35

atc att ggc gac gac gcg gtg atg gtg atc gac acc cag gcc acg ccc 738  
 Ile Ile Gly Asp Asp Ala Val Met Val Ile Asp Thr Gln Ala Thr Pro  
 40 45 50 55

gtc atg gcc cag gac gtg atc cgc cgc atc cgt gag gtc acg gac aag 786  
 Val Met Ala Gln Asp Val Ile Arg Arg Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys  
 60 65 70

ccc atc aag tac gtg acg ctg tcg cac tac cac gcg gtg cgc gtg ctg 834  
 Pro Ile Lys Tyr Val Thr Leu Ser His Tyr His Ala Val Arg Val Leu  
 75 80 85

ggc gcc tcg gcc ttc ttc gcg gaa ggc gcc gaa cac atc att gcc agc 882  
 Gly Ala Ser Ala Phe Phe Ala Glu Gly Ala Glu His Ile Ile Ala Ser  
 90 95 100

cag gac acc tac gac ctc atc gtg gag cgc ggc gag cag gac aag gcc 930  
 Gln Asp Thr Tyr Asp Leu Ile Val Glu Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala  
 105 110 115

agc gag atc ggc cgc ttt ccc cgc ctg ttc cag aac gtg gaa agc gtg 978  
 Ser Glu Ile Gly Arg Phe Pro Arg Leu Phe Gln Asn Val Glu Ser Val  
 120 125 130 135

ccc gat ggc atg acc tgg ccc acc ctc acc ttc acc ggc aag atg acg 1026  
 Pro Asp Gly Met Thr Trp Pro Thr Leu Thr Phe Thr Gly Lys Met Thr  
 140 145 150

ctg tgg ctg ggc aag ctg gaa gtg cag atc ctg cag ctg ggc cgc ggc 1074  
 Leu Trp Leu Gly Lys Leu Glu Val Gln Ile Leu Gln Leu Gly Arg Gly  
 155 160 165 170  
 cac acc aag ggc gac acc gtg gtc tgg ctg ccc cag gac aag gtg ctg 1122  
 His Thr Lys Gly Asp Thr Val Val Trp Leu Pro Gln Asp Lys Val Leu  
 170 175 180  
 ttc agc ggc gac ctg gtg gag ttc ggc gcc acg ccc tat gcg ggc gat 1170  
 Phe Ser Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly Ala Thr Pro Tyr Ala Gly Asp  
 185 190 195  
 gcc tac ttc cag gac tgg ccg cac acg ctg gac gcc atc gcc gcc ctg 1218  
 Ala Tyr Phe Gln Asp Trp Pro His Thr Leu Asp Ala Ile Ala Ala Leu  
 200 205 210 215  
 cag ccc gaa aag ctc gtg ccc ggc cg<sup>g</sup> ggc gcc gcg ctg cag acg ccg 1266  
 Gln Pro Glu Lys Leu Val Pro Gly Arg Gly Ala Ala Leu Gln Thr Pro  
 220 225 230  
 gcc gag gtg cag gcc ggc ctg gcc ggc acg cgc gac ttc atc agc gac 1314  
 Ala Glu Val Gln Ala Gly Leu Ala Gly Thr Arg Asp Phe Ile Ser Asp  
 235 240 245  
 ctg tgg acc gag gtc aag gcc ggc gat gcc cag cag gac ctg cgc 1362  
 Leu Trp Thr Glu Val Lys Ala Gly Ala Asp Ala Gln Gln Asp Leu Arg  
 250 255 260  
 aag gtc tac gag gcc gcc ttc gcc aag ctg cag ccc aag tac ggc cag 1410  
 Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys Leu Gln Pro Lys Tyr Gly Gln  
 265 270 275  
 tgg gtg atc ttc aac cac tgc atg ccc ttc gat gtg acc cgc gcc tat 1458  
 Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr  
 280 285 290 295  
 gac gag gca tcg ggc cac gcc gac cca cgc atc tgg acc gcc gag cgc 1506  
 Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg  
 300 305 310  
 gac cgc cag atg tgg ctg gcg ctc gaa ggc tga tgcaagctta tcgataaccgt 1559  
 Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu Gly  
 315 320  
 cgacgaattt ccccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg 1619  
 ttgccgtct tgcgatgatt atcatataat ttctgttcaa ttacgttaag catgtaataa 1679  
 ttaacatgta atgcgtacg ttatattga gatgggtttt tatgattaga gtccccaat 1739  
 tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc 1799  
 gcgcggtgtc atctatgtta ctagatcggg aattgcggcc 1839

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 142

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: cassette d'expression

&lt;400&gt; 20

Lys Val Leu Phe Ser Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly Ala Thr Pro Tyr  
 1 5 10 15

Ala Gly Asp Ala Tyr Phe Gln Asp Trp Pro His Thr Leu Asp Ala Ile

20	25	30
Ala Ala Leu Gln Pro Glu Lys Leu Val Pro Gly Arg Gly Ala Ala Leu		
35	40	45
Gln Thr Pro Ala Glu Val Gln Ala Gly Leu Ala Gly Thr Arg Asp Phe		
50	55	60
Ile Ser Asp Leu Trp Thr Glu Val Lys Ala Gly Ala Asp Ala Gln Gln		
65	70	75
Asp Leu Arg Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys Leu Gln Pro Lys		
85	90	95
Tyr Gly Gln Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro Phe Asp Val Thr		
100	105	110
Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro Arg Ile Trp Thr		
115	120	125
Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu Gly		
130	135	140

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 4677

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: cassette d'expression

&lt;400&gt; 21

ccccctcgag gtcgacggta ttgatcagct tccagaagg aattatccaa gatgttagcat 60  
 caagaatcca atgtttacgg gaaaaactat ggaagtatta tgtgagctca gcaagaagca 120  
 gatcaatatg cggcacatat gcaacctatg ttcaaaaatg aagaatgtac agataacaaga 180  
 tcctatactg ccagaatacg aagaagaata cgtagaaatt gaaaaagaag aaccaggcga 240  
 agaaaaagaat cttgaagacg taagcactga cgacaacaat gaaaagaaga agataaggc 300  
 ggtgattgtg aaagagacat agaggacaca tgtaagggtgg aaaatgtaa ggcggaaagt 360  
 aaccttatca caaaggaatc ttatccccca ctacttatcc ttttatattt ttccgtgtca 420  
 ttttgccct ttagtttcc tatataagga accaagttcg gcatttgtga aaacaagaaa 480  
 aaatttggtg taagctattt tctttgaagt actgaggata caacttcaga gaaatttgta 540  
 agtttgtaga tctgaattcg atgcaggatg cacatgtcca ccaagacctt tgcctccgcc 600  
 gccgacctcg aaatcaagca ggtcagcttc gacaagctct ccgagcacgc ctatgcctac 660  
 acggccgaag gcgaccccaa caccggcatac atcattggcg acgacgcggc gatggtgatc 720  
 gacacccagg ccacgcccgt catggcccag gacgtgatcc gccgcattcc tgaggtcacg 780  
 gacaagccca tcaagtacg gacgctgtcg cactaccacg cggtgccgcgt gctggccgc 840  
 tcggccttct tcggcggagg cgccgaacac atcattgcca gccaggacac ctacgacactc 900  
 atcgtggagc gccccgagca ggacaaggcc agcgagatcg gccgcttcc ccgcctgttc 960  
 cagaacgtgg aaagcgtgcc cgatggcatg acctggccca ccctcacctt cacggcgaag 1020

atgacgctgt ggctggcaa gctggaagtgc agatcctgc agctggccg cggccacacc 1080  
aaggcgaca ccgtggtctg gctgccccag gacaagggtgc tttcagcgg cgacctgg 1140  
gagttcggcg ccacgccta tgccccatgcat gcctacttcc aggactggcc gcacacgctg 1200  
gacgccatcg cccgcctgca gcccggaaag ctctgtccccg gccggggcgc cgctgcag 1260  
acgcccggccg aggtgcaggc cggcctggcc ggcacgcgc acttcattcag cgacctgtgg 1320  
accgaggtca aggccggcgc cgatgcccag caggacccatgc gcaaggctta cgaggccg 1380  
ttcgccaagc tgcagccaa gtacggccag tgggtgatct tcaaccactg catgccttc 1440  
gatgtgaccc ggcctatgcg cgaggcatcg ggccacgcgc acccacgcac ctggaccg 1500  
gagcgcgacc gccagatgtg gctggcgctc gaaggctgat gcaagcttat cgataccg 1560  
gacgaatttc cccgatcgaa caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatccgt 1620  
tgccggtctt gcgtatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtataat 1680  
taacatgtaa tgcgtacgt tattatgag atgggtttt atgatttagag tcccgcaatt 1740  
atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcg 1800  
cgccgtgtca tctatgttac tagatcg 1860  
tttagagggc ttacgcagca ggtctcatca agacgatcta cccgagcaat aatctccagg 1920  
aaatcaaata cttcccaag aaggttaaag atgcagtcaa aagattcagg actaactgca 1980  
tcaagaacac agagaaagat atatttctca agatcagaag tactattcca gtatggacga 2040  
ttcaaggctt gttcacaaa ccaaggcaag taatagagat tggagtctct aaaaaggtag 2100  
ttcccactga atcaaaggcc atggagtcaa agattcaa ataggaccta acagaactcg 2160  
ccgtaaagac tggcgaacag ttcatcaga gtctttacg actcaatgac aagaagaaaa 2220  
tctcgtcaa catggtggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatatc aaagatacag 2280  
tctcagaaga ccaaaggca attgagactt ttcaacaaag ggtatatcc gaaacctcc 2340  
tcggattcca ttgcccagct atctgtcaact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaagg 2400  
gctcctacaa atgcccattcat tgcgataaag gaaaggccat cggtgaagat gcctctgc 2460  
acagtggtcc caaagatgga cccccacccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc 2520  
caaccacg 2580  
cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaaggatca ttcatattgg 2640  
agagaacacg gggactcta gaggatcaga ggacgaaacaa catgtccac cccgcacatct 2700  
ccctgcaagc gctgcgcggc agcggcg 2760  
ccatgcgca ccaggacg 2820  
gcccggccc cgtggccctg tcgctggcca tcgacccatggc ccagcgcggc cagcgcgtgg 2880  
tgctgctgga caacgactgc cggctgtcca cgggctgcgc cgccatctgc ttttcaagc 2940  
gcacgctgga gatctggac cgcctggcg tggccagcc catggtgac aagggcgtgt 3000  
cctggAACCT gggcaagg 3060

ccgaggacgg ccacgagcgc cggccttca tcaacctgca gcagtactac gccgaggcct 3120  
 atctggtcga gcgcgcactg cagctgccgc tgatcgacct gcgcgtggcac agcaaggtca 3180  
 cggcactgga gcccgcaggcc gagggcgcgc tgctgaccgt ggagacgcct gacggcagct 3240  
 accgcacatcga tgcgcaatgg gtcctggcct gcgcattggcgc gcgcgcgcgc ctgcgcggcc 3300  
 tgctggccca ggaaagccat ggccgcacatc tccgcgaccg cttccctgatc gccgacgtga 3360  
 agatgcacgc cgaattcccc accgagcgct ggttctggtt cgacccgcgg ttccacccgg 3420  
 gcccagacgt gctgctgcac cggccagcccg acgatgtctg gcgcacgcac ttccagctgg 3480  
 gctgggacgc ggaccccgag gaagagaaaa agcccgagaa catcgccgc cgcacccgc 3540  
 ccctgctggg caaggacgcg cccttcgagc tggaatgggc cagcgctcac accttcgcct 3600  
 gcctgcgcac ggaccgcctt gtccatggcc gcgtggtctt tgcgggcgcac agcccccacg 3660  
 gcgtctcgcc gtttggcgca cgcggcgcca acagcggcgt gcaggatgcc gagaacctgg 3720  
 catggaagct ggaccgcgtg ctgcgcggcc aggccgatgc ctgcgtgate gccacctacg 3780  
 gcgcgcagcg cgaatacgcg gccgacgaga acatccgcaa ctccacgcgc gccaccgact 3840  
 tcatacgcac caagagcgag atcagccgac tgttcgcga cgcgtgctg gacctggcgc 3900  
 gcgaccatga attcgccgc cgcacgtca acagcggcg gctgtccgtg cggccacacg 3960  
 tgcacggctc cgcgctcaac acgcctgaca ccgacacctt cgacggAACG cagctcccc 4020  
 gcgcgtgtct ggccgatgcg cccatgcgc cgcggcgcc agacggcact gcctggctgc 4080  
 tgcgcgcact gggaccggac ttacgcgtgc tgcacttcga cccacgcgc gcctggcgcc 4140  
 aggegctgcc cggcgtgtc aacctgtcca tgcggccga gggcgaggcc catgcgcacg 4200  
 acgcccaccc catcgatgcg cggccgtgg cggccaaacg cctggatgca cgcggcgca 4260  
 ccagctaccc gctgcggcct gaccagcatg tctgcgcgcg ctggcgccgc cccgacgaag 4320  
 ccagcgtgcg cgcgcgcgt caaagagcct cggcgcgcgc cgcacggcc tgaacctctt 4380  
 aagtttatcg ataccgtcga cgaatttccc cgatcggtca aacatttggc aataaagttt 4440  
 cttaagattt aatcctgttg cgggtttgc gatgattatc atataatttc tggtaatta 4500  
 cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta ttatgagat gggttttat 4560  
 gatttagatc cgcacattat acatthaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcAAA 4620  
 ctaggataaa ttatcgccgc cgggttcatc tatgttccta ggtcgaaat tgccggcc 4677

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 8187

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: cassette d'expression

&lt;400&gt; 22

cccctcgag gtcgacggta ttgatcgatc tccagaaggt aattatccaa gatgtacat 60  
 caagaatcca atgtttacgg gaaaaactat ggaagtatta tgtgagctca gcaagaagca 120

gatcaatatg cggcacatat gcaacctatg ttcaaaaaatg aagaatgtac agataacaaga 180  
tcctatactg ccagaatacg aagaagaata cgtagaaatt gaaaaagaag aaccaggcga 240  
agaaaagaat cttgaagacg taagcactga cgacaacaat gaaaagaaga agataaggc 300  
ggtgattgtg aaagagacat agaggacaca tgtaaggtagg aaaatgtaa ggcggaaagt 360  
aaccttatca caaaggaatc ttatccccca ctacttatcc ttttatattt ttccgtgtca 420  
tttttgcct tgagtttcc tatataagga accaagttcg gcatttgtga aaacaagaaa 480  
aaatttggtg taagctattt tcttgaagt actgaggata caacttcaga gaaattgtaa 540  
agtttgtaga tctgaattcg atgcaggatg cacatgtcca ccaagacett tgcctccgcc 600  
gccgacctcg aaatcaagca ggtcagcttc gacaagctct ccgagcacgc ctatgcctac 660  
acggccgaag gcgaccccaa caccggatc atcattggcg acgacgcgg gatggtgatc 720  
gacacccagg ccacgcccgt catggccag gacgtgatcc gccgcatecg tgaggtcacf 780  
gacaagccca tcaagtgacgt gacgtgtcg cactaccacg cggtgccgt gctggcgcc 840  
tcggccttct tcgcggaagg cgccgaacac atcattgcca gccaggacac ctacgacctc 900  
atcgtggagc gcggcgagca ggacaaggcc agcgagatcg gccgctttcc ccgectgttc 960  
cagaacgtgg aaagcgtgcc cgatggcatg acctggccca ccctcacctt cacccgcaag 1020  
atgacgctgt ggctggccaa gctggaagtg cagatcctgc agctggcccg cggccacacc 1080  
aaggcgaca ccgtggctcg gctgccccag gacaagggtgc tggcagcgg cgacctggcg 1140  
gagttcggcg ccacgcccata tgccggcgat gcctacttcc aggactggcc gcacacgctg 1200  
gacgccatcg ccgcctcgca gcccggaaag ctcgtggccg gccggggcgc cgcgctgcag 1260  
acgcccggccg aggtgcagggc cggcctggcc ggcacgcgcg acttcatcag cgacctgtgg 1320  
accgaggctca aggccggcgc cgatgcccag caggacctgc gcaaggctca cgaggccgcc 1380  
ttcgccaagc tgcagccaa gtacggccag tgggtgatct tcaaccactg catgccttc 1440  
gatgtgaccc gcgcctatga cgaggcatcg ggccacgcgc acccacgcgt ctggaccgc 1500  
gagcgcgacc gccagatgtg gctggcgctc gaaggctgat gcaagcttgc cgataccgtc 1560  
gacgaatttc cccgatcggtt caaacatttg gcaataaaat ttcttaagat tgaatccgt 1620  
tgccggctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 1680  
taacatgtaa tgcgtacgt tattttagag atgggtttt atgatttagag tcccccaatt 1740  
atacatttaa tacgcgatacg aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 1800  
cgccgggtca tctatgttac tagatcgga attgcggccc ccctcgagc ccacagatgg 1860  
tttagagaggc ttacgcagca ggtctcatca agacgatcta cccgagcaat aatctccagg 1920  
aaatcaaata cttcccaag aaggtaaag atgcagtcaa aagattcagg actaactgca 1980  
tcaagaacac agagaaagat atatttctca agatcagaag tactattcca gtatggacga 2040  
ttcaaggctt gcttcacaaa ccaaggcaag taatagagat tggagtctct aaaaaggttag 2100  
ttccccactga atcaaaggcc atggagtcaa agattcaa atgaggaccta acagaactcg 2160

ccgtaaaagac tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa 2220  
tcttcgtcaa catggtgag cacgacacac ttgtctactc caaaaatatc aaagatacag 2280  
tctcagaaga ccaaaggca attgagactt ttcaacaaag gtaatatcc ggaaacctcc 2340  
tcggattcca ttgcccagct atctgtcaact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaggtg 2400  
gctcctacaa atgccatcat tgcgataaaag gaaaggccat cggtgaagat gcctctgccc 2460  
acagtggtcc caaagatgga cccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc 2520  
caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgtatgtatctc cactgacgta agggatgacg 2580  
cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg 2640  
agagaacacg ggggactcta gaggatcaga ggacgaacaa catgtcccac cccgcacatct 2700  
ccctgcaagc gctgcgcggc agcggcgcag acatacagtc catccacatc ccctacgagc 2760  
gccatgcccga ccaggacgccc ggtgcggaca cggccgcggc gcatccgtc gtcatcgctg 2820  
gcggccggccc cgtgggctg tcgctggca tcgacctggc ccagcgcggc cagcgcgtgg 2880  
tgctgctgga caacgactgc cggtgtcca cgggctcgcg cgccatctgc ttttccaagc 2940  
gcacgctgga gatctggac cgcctggcg tggccagcc catggtggac aaggcgtgt 3000  
cctggAACCTT gggcaaggc ttcttcaagg accagccgct gtaccgcttc gacctgtgc 3060  
ccgaggacgg ccacgagcgc cggccttca tcaacctgca gcaactac gcccggcct 3120  
atctggtcga ggcgcactg cagctgcgc tgatcgaccc ggcgtggcac agcaaggcgtca 3180  
cggcactgga gccgcaggcc gagggcgcgc tgctgaccgt ggagacgcct gacggcagct 3240  
accgcacatcg tgcgcaatgg gtccctggcct gcatggctc ggcgcgcgc ctgcggccc 3300  
tgctggcca ggaaaggccat ggccgcacatc tccgcgaccg ctccctgatc gcccacgtga 3360  
agatgcacgc cgaattcccc accgagcgtt ggttctggtt cgacccgcggc ttccacccgg 3420  
gccagagcgt gctgctgcac cgccagcccg acgatgtctg ggcacatcgac ttccacgtgg 3480  
gttggacgc ggaccccgag gaagagaaaa agcccgagaa catcgccgc cgcacccgcg 3540  
ccctgctggg caaggacgcg ccctcgagc tggaatggc cagcgtctac accttcgcct 3600  
gcctgcgcac ggaccgcctt gtcacatggcc gcgtggttt tgcggcgcac agcgcacccacg 3660  
gcgttcgcgc gtttggcgcac cgccggccca acagcggcgt gcaggatgcc gagaacctgg 3720  
catggaagct ggaccgcgtg ctgcgcggcc aggccgtatgc ctgcgtgatc gcccacatcg 3780  
gcgcgcgcg cgaatacgcg gccgacgaga acatccgcaa ctccacgcgc gcccacccact 3840  
tcatcacgcc caagagcgtg atcagccgc ttttcgcgtc cgcgtgtgc gacctggcgc 3900  
gcgaccatga attcgcgcgc cgcacatcgta acagcggcgt gctgtccgtg cggccacgc 3960  
tgcacggctc cgcgtcaac acgcctgaca cgcacaccc cgcacggacg cagctcccg 4020  
gcgcgcgtgtt ggccgtatgcg cccatgcgc cggccggcc agacggcact ggcgtgtgc 4080  
tgcgcgcact gggaccggac ttacacgtgc tgcacttcga cccacgcgc gctggcgc 4140  
aggcgctgcc cggcgtgtc aacctgtcca tgcggccga gggcgaggcc catgcgcac 4200

acgcccacct catcgatgcg cgccgcctgg cggccaaacg cctggatgca cgccccggca 4260  
ccagctacct gctgcggcct gaccagcatg tctgcgcgcg ctggcgccgc cccgaaaag 4320  
ccagcgtgcg cgccgcgcgtg caaagagcct gcggcgccgc cgccacggcc tgaacctt 4380  
aagcttatcg ataccgtcga cgaatttccc cgatcgttca aacatttggc aataaagttt 4440  
cttaagattg aatcctgttg ccggctttgc gatgattatc atataatttc tggtgaatta 4500  
cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggttttat 4560  
gattagagtc ccgcaattat acatthaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa 4620  
ctaggataaa ttatcgcgcg ccgtgtcatc tatgttccta ggtcgaggag aaatatgagt 4680  
cgaggcatgg atacactaag ttccctgaa gtgagcatga tctttgatgc tgagatgatt 4740  
cccagagcaa gatagtttgt gctgcaagtgc acacaattgt aatgaaacca ccactcaacg 4800  
aatttacttg tggctttgac atgtcgtgtg ctctgttgtt atttgtgagt gccggttgt 4860  
aattatttt gttaatgtga tttaaaacc tcttatgtaa atagttactt tatctattga 4920  
agtgtttct tgggtctat agtttctcaa agggaaattha aatgttgac atcccattta 4980  
caattgataa ttgggtatac acaaactttg taaatttgtt gatattttagt gtcgaaagaa 5040  
ggcaatacc attgtatgtt ccaatataa tatcaatacg ataacttgat aatactaaca 5100  
tatgattgtc attgttttc cagttatcaat atacattaag ctactacaaa attagtataa 5160  
atcactatataaaatctt ttccgttgtt aacttgtaat tcgtgggttt taaaataaaa 5220  
agcatgtgaa aattttcaaa taatgtgatg gogcaatttt attttccgag ttccaaaata 5280  
ttggcgcttc attaccctaa ttgtggcgcc cacatgtaaa acaaaagacg attcttagtg 5340  
gctatcactg ccatcacgcg gatcaactat atgaaccgtc gataaaaca gatcgacgg 5400  
ttatacatca ttttattgtt cacacggatc gatatctcag ccgttagatt taatatgcga 5460  
tctgattgct caaaaaatag actctccgtc ttgcctataa aaaacaattt cacatcttc 5520  
tcacccaaat ctactctaa ccgttctct tcttctacag acatcaattt ctctcgactc 5580  
tagaggatcc aagcttatcg atttcgaacc cctcatgact tcacttacag tgtccggccg 5640  
ggtggcgccag gtcctcagca gctatgtcag cgatgtttc ggtgtgatgg gcaacggaaa 5700  
cgtctacttc ctggacgcggccg ccgagaagga gggcctccgc ttacggccgc tacgccatga 5760  
aggtggccgc atcgccggccg cggacgccta ctatcgggca tccggccgc tggccggccg 5820  
gaccaccacc tacggccccc gttacaccaa cggccctgacg gcccctgcgg aggccgtcca 5880  
ggcgcagatc cccgtggtgc tcgtcaccgg ggacgccccg agcagccgcg cccggccctt 5940  
ggacgtggac caggccgcga tcgcccggc gctggggcg ggcacccatca cggtcacccg 6000  
tgaagccgca ggctccatca cgcaggaagc ggtggagttac gcacttgccc ggcggaccgc 6060  
cgtcgtgatc ggcgttccat acgacctgtc ggcccttgag gcggccggagg aagatottcc 6120  
cgtgccgcgcg gggcctcgg ttccggacgc catcgccggc ggactcgac gggccggccga 6180  
agtgcggccg gccgaattgc tggccggccgc gaagccggccg ctcatccttgc cggccgcgg 6240

8187

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale**  
**10 mai 2002 (10.05.2002)**

**(10) Numéro de publication internationale**  
**PCT WO 02/036787 A3**

**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>:**  
**C12N 15/82, 9/02, 15/62, A01H 5/00**

**(21) Numéro de la demande internationale :**  
**PCT/FR01/03364**

**(22) Date de dépôt international :**  
**30 octobre 2001 (30.10.2001)**

**(25) Langue de dépôt :**  
**français**

**(26) Langue de publication :**  
**français**

**(30) Données relatives à la priorité :**  
**00/13942 30 octobre 2000 (30.10.2000) FR**

**(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :** AVEN-TIS CROPS SCIENCE S.A. [FR/FR]; 55, avenue René Cassin, F-69009 Lyon (FR).

**(72) Inventeurs; et**

**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** ZINK, Olivier [FR/FR]; 1, place du Sausage, F-63000 Clermont-Ferrand (FR). PAGET, Eric [FR/FR]; 123, avenue du Général de Gaulle, F-69300 Caluire (FR). ROL-LAND, Anne [FR/FR]; 41, rue Louis Bouquet, F-69009 Lyon (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR]; 47 chemin de Crécy, F-63370 Saint-Didier-au-Mont-d'Or (FR). FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nervieux, F-69450 Saint-Cyr-au-Mont-d'Or (FR).

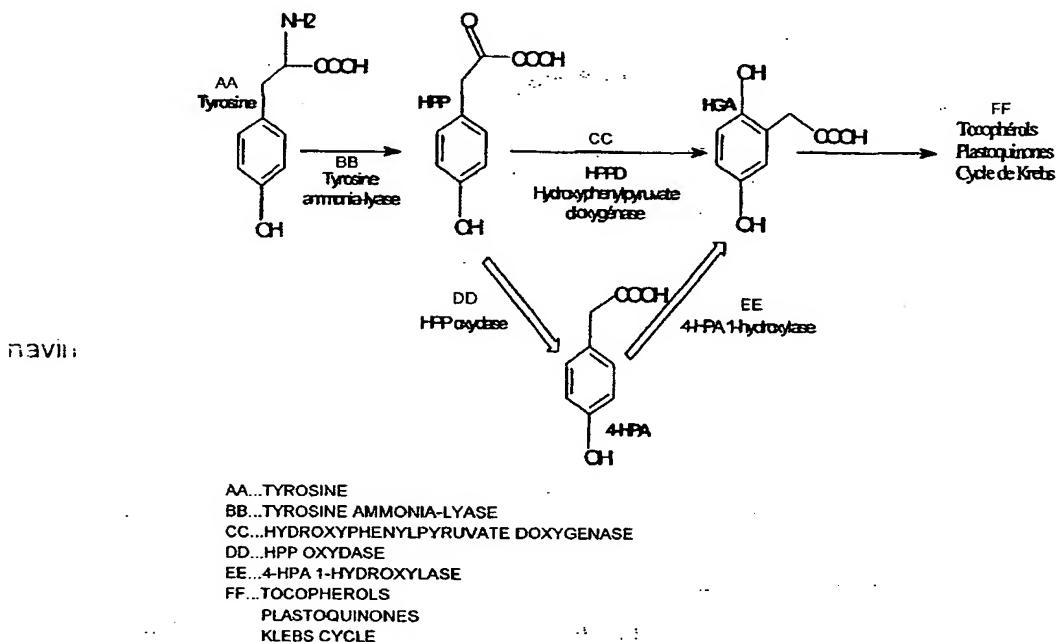
**(74) Mandataire :** MONCONDUIT, Hervé; Aventis Crop-Science S.A., 14-20, rue Pierre Baizet, B.P. 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).

**(81) États désignés (national) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,

[Suite sur la page suivante]

**(54) Title: HERBICIDE-TOLERANT PLANTS THROUGH BYPASSING METABOLIC PATHWAY**

**(54) Titre : PLANTES TOLERANTES AUX HERBICIDES PAR CONTOURNEMENT DE VOIE METABOLIQUE**



**(57) Abstract:** The invention concerns a novel method for making herbicide-tolerant plants, in particular to HPPD inhibiting herbicides, the nucleic acid sequences coding for enzymes capable of being used in said method, expression cassettes containing them and transgenic plants comprising at least one of said expression cassettes.

[Suite sur la page suivante]

WO 02/036787 A3

LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
 MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
 SL, TJ; TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
 ZW.  
 SG, SI, SK, SL, TJ; TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,  
 ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,  
 SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG,  
 KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY,  
 DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE,  
 TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
 GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)  
 relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US  
 seulement.

- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un brevet (règle 4.17.ii)) pour les désignations suivantes AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE,

- (88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

29 août 2002

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

- (57) Abrégé : La présente invention concerne une nouvelle méthode permettant de rendre les plantes tolérantes aux herbicides, en particulier aux herbicides inhibiteurs d'HPPD, les séquences d'acides nucléiques codant pour des enzymes susceptibles d'être employées dans cette méthode, les cassettes d'expression les contenant et les plantes transgéniques comprenant au moins l'une de ces cassettes d'expression.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 01/03364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N15/62 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 38567 A (MATRINGE MICHEL ;ROLLAND ANNE (FR); SAILLAND ALAIN (FR); RHONE POU) 5 December 1996 (1996-12-05) cited in the application the whole document ---	1-3
A	WO 99 24585 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 20 May 1999 (1999-05-20) cited in the application the whole document ---	1-3
A	WO 99 53081 A (BRYAN IAN BENNETT ;SHIPTON CATHERINE ANN (GB); ZENECA LTD (GB)) 21 October 1999 (1999-10-21) cited in the application the whole document ---	1-3
--/--		

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 May 2002

Date of mailing of the international search report

14/05/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 01/03364

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 34008 A (DEROSE RICHARD ; SAILLAND ALAIN (FR); RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR)) 8 July 1999 (1999-07-08) cited in the application the whole document ---	4-14
Y	EP 0 343 100 A (SCHERING AG) 23 November 1989 (1989-11-23) the whole document ---	15-20
X	PRIETO M A ET AL: "Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of Escherichia coli W: Engineering a mobile aromatic degradative cluster." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 178, no. 1, 1996, pages 111-120, XP002172217 ISSN: 0021-9193 the whole document ---	8, 10, 11, 13-15, 17-20
X	EP 0 633 317 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 11 January 1995 (1995-01-11) claim 4; example 1 ---	16, 19, 20
X	WO 98 21348 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 22 May 1998 (1998-05-22) page 26; claims 1,2,17,21-24 ---	17, 19-24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/03364

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9638567	A 05-12-1996		FR 2734840 A1 FR 2734841 A1 FR 2734842 A1 AU 718982 B2 AU 6228696 A BG 102131 A BR 9608375 A CA 2219979 A1 CN 1192243 A CZ 9703809 A3 EP 0828837 A2 WO 9638567 A2 HR 960245 A1 HU 9900450 A2 JP 11505729 T NZ 311055 A PL 323679 A1 SK 161597 A3 TR 9701492 T1 US 6268549 B1	06-12-1996 06-12-1996 06-12-1996 04-05-2000 18-12-1996 31-07-1998 05-01-1999 05-12-1996 02-09-1998 18-03-1998 18-03-1998 05-12-1996 31-08-1997 28-05-1999 25-05-1999 28-02-2000 14-04-1998 08-07-1998 21-02-1998 31-07-2001
WO 9924585	A 20-05-1999		FR 2770854 A1 AU 1160399 A AU 738279 B2 AU 1161499 A CA 2309318 A1 CA 2309322 A1 CN 1285875 T EP 1029059 A1 EP 1029060 A1 WO 9924585 A1 WO 9924586 A1 JP 2001522608 T US 6245968 B1 ZA 9810076 A	14-05-1999 31-05-1999 13-09-2001 31-05-1999 20-05-1999 20-05-1999 28-02-2001 23-08-2000 23-08-2000 20-05-1999 20-05-1999 20-11-2001 12-06-2001 07-05-1999
WO 9953081	A 21-10-1999		AU 3429899 A BR 9909501 A CA 2321965 A1 CN 1296526 T EP 1078084 A1 WO 9953081 A1	01-11-1999 12-12-2000 21-10-1999 23-05-2001 28-02-2001 21-10-1999
WO 9934008	A 08-07-1999		FR 2772789 A1 AU 740209 B2 AU 1880899 A CA 2315903 A1 EP 1042496 A1 WO 9934008 A1	25-06-1999 01-11-2001 19-07-1999 08-07-1999 11-10-2000 08-07-1999
EP 0343100	A 23-11-1989		DE 3817384 A1 AT 108202 T CA 1338440 A1 DE 58907998 D1 DK 231289 A EP 0343100 A2 ES 2059815 T3 IE 67527 B1	30-11-1989 15-07-1994 09-07-1996 18-08-1994 20-11-1989 23-11-1989 16-11-1994 03-04-1996

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/03364

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0343100	A		JP 2128689 A	17-05-1990
			JP 2801263 B2	21-09-1998
			US 5543306 A	06-08-1996
			US 5846803 A	08-12-1998
			US 5948670 A	07-09-1999
			US 5347076 A	13-09-1994
			US 6060645 A	09-05-2000
EP 0633317	A	11-01-1995	FR 2706909 A1	30-12-1994
			AU 680899 B2	14-08-1997
			AU 6594794 A	05-01-1995
			BR 9401842 A	17-01-1995
			CA 2126806 A1	26-12-1994
			EP 0633317 A1	11-01-1995
			JP 7008278 A	13-01-1995
			US 6313282 B1	06-11-2001
			ZA 9404508 A	12-04-1995
WO 9821348	A	22-05-1998	WO 9821348 A1	22-05-1998

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No  
PCT/FR 01/03364

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N15/62 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 38567 A (MATRINGE MICHEL ; ROLLAND ANNE (FR); SAILLAND ALAIN (FR); RHONE POU) 5 décembre 1996 (1996-12-05) cité dans la demande le document en entier	1-3
A	WO 99 24585 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 20 mai 1999 (1999-05-20) cité dans la demande le document en entier	1-3
A	WO 99 53081 A (BRYAN IAN BENNETT ; SHIPTON CATHERINE ANN (GB); ZENECA LTD (GB)) 21 octobre 1999 (1999-10-21) cité dans la demande le document en entier	1-3
	---	-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgarion orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 mai 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/05/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Oderwald, H

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande Internationale No

PCT/FR 01/03364

**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 34008 A (DEROSE RICHARD ; SAILLAND ALAIN (FR); RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR)) 8 juillet 1999 (1999-07-08) cité dans la demande le document en entier	4-14
Y	EP 0 343 100 A (SCHERING AG) 23 novembre 1989 (1989-11-23) le document en entier	15-20
X	PRIETO M A ET AL: "Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of Escherichia coli W: Engineering a mobile aromatic degradative cluster." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 178, no. 1, 1996, pages 111-120, XP002172217 ISSN: 0021-9193 le document en entier	8, 10, 11, 13-15, 17-20
X	EP 0 633 317 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 11 janvier 1995 (1995-01-11) revendication 4; exemple 1	16, 19, 20
X	WO 98 21348 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 22 mai 1998 (1998-05-22) page 26; revendications 1, 2, 17, 21-24	17, 19-24

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR-01/03364

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
WO 9638567	A 05-12-1996	FR 2734840 A1 FR 2734841 A1 FR 2734842 A1 AU 718982 B2 AU 6228696 A BG 102131 A BR 9608375 A CA 2219979 A1 CN 1192243 A CZ 9703809 A3 EP 0828837 A2 WO 9638567 A2 HR 960245 A1 HU 9900450 A2 JP 11505729 T NZ 311055 A PL 323679 A1 SK 161597 A3 TR 9701492 T1 US 6268549 B1		06-12-1996 06-12-1996 06-12-1996 04-05-2000 18-12-1996 31-07-1998 05-01-1999 05-12-1996 02-09-1998 18-03-1998 18-03-1998 05-12-1996 31-08-1997 28-05-1999 25-05-1999 28-02-2000 14-04-1998 08-07-1998 21-02-1998 31-07-2001
WO 9924585	A 20-05-1999	FR 2770854 A1 AU 1160399 A AU 738279 B2 AU 1161499 A CA 2309318 A1 CA 2309322 A1 CN 1285875 T EP 1029059 A1 EP 1029060 A1 WO 9924585 A1 WO 9924586 A1 JP 2001522608 T US 6245968 B1 ZA 9810076 A	14-05-1999 31-05-1999 13-09-2001 31-05-1999 20-05-1999 20-05-1999 28-02-2001 23-08-2000 23-08-2000 20-05-1999 20-05-1999 20-11-2001 12-06-2001 07-05-1999	
WO 9953081	A 21-10-1999	AU 3429899 A BR 9909501 A CA 2321965 A1 CN 1296526 T EP 1078084 A1 WO 9953081 A1	01-11-1999 12-12-2000 21-10-1999 23-05-2001 28-02-2001 21-10-1999	
WO 9934008	A 08-07-1999	FR 2772789 A1 AU 740209 B2 AU 1880899 A CA 2315903 A1 EP 1042496 A1 WO 9934008 A1	25-06-1999 01-11-2001 19-07-1999 08-07-1999 11-10-2000 08-07-1999	
EP 0343100	A 23-11-1989	DE 3817384 A1 AT 108202 T CA 1338440 A1 DE 58907998 D1 DK 231289 A EP 0343100 A2 ES 2059815 T3 IE 67527 B1	30-11-1989 15-07-1994 09-07-1996 18-08-1994 20-11-1989 23-11-1989 16-11-1994 03-04-1996	

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 01/03364

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0343100	A	JP 2128689 A JP 2801263 B2 US 5543306 A US 5846803 A US 5948670 A US 5347076 A US 6060645 A	17-05-1990 21-09-1998 06-08-1996 08-12-1998 07-09-1999 13-09-1994 09-05-2000
EP 0633317	A 11-01-1995	FR 2706909 A1 AU 680899 B2 AU 6594794 A BR 9401842 A CA 2126806 A1 EP 0633317 A1 JP 7008278 A US 6313282 B1 ZA 9404508 A	30-12-1994 14-08-1997 05-01-1995 17-01-1995 26-12-1994 11-01-1995 13-01-1995 06-11-2001 12-04-1995
WO 9821348	A 22-05-1998	WO 9821348 A1	22-05-1998